

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio y aprovechamiento de patrones en la microbiota de Caudata para la potencial mitigación de patógenos emergentes: un enfoque bioinformático integral

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Presenta

M. en C. Jimena Ramírez Villarreal

Dirigido por

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez

Laboratorio de Biología Cuantitativa y Sistemas Complejos

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



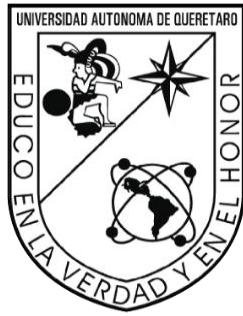
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio y aprovechamiento de patrones en la microbiota de Caudata para la potencial mitigación de patógenos emergentes: un enfoque bioinformático integral

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas
Presenta

M. en C. Jimena Ramírez Villarreal

Dirigido por

Dr. Roberto Álvarez Martínez

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez
Presidente

Dra. Etzel Garrido Espinosa
Secretario

Dr. Carlos Alberto López González
Vocal

Dr. Fidel Landeros Jaime
Suplente

Dra. Eria Rebollar Caudillo
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha: 20 Abril 2026.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo recibido por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) con el número de beca 1003112.

Este trabajo fue elaborado gracias al programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Se agradece el apoyo de la coordinación del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y las instalaciones de la Facultad de Ciencias Naturales.

Se hace un especial agradecimiento por aceptarme dentro del grupo de trabajo, así como de brindar las instalaciones, equipo, recursos, necesarios para elaborar esta tesis al Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez y al Laboratorio de Biología Cuantitativa y Sistemas Complejos. Espero haber dejado una huella agradable en el laboratorio y con todos mis colegas.

Se agradece también el apoyo recibido por parte del comité de sinodal, a los doctores: Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez, Dra. Etzel Garrido Espinosa, Dr. Carlos Alberto López González, Dr. Fidel Landeros Jaime y a la Dra. Eria Rebollar Caudillo sin sus comentarios, apoyo y retroalimentación no hubiera sido posible terminar en tiempo y forma este proyecto. Agradezco mucho su tiempo.

Finalmente, lo más importante... Un agradecimiento especial para la Dra. Olga Patricia García Obregón y el Dr. Carlos Alberto López González, gracias por todo su apoyo, tiempo, guía y sobre todo la paciencia que me brindaron en tiempos que fueron difíciles, sin su ayuda el finalizar esta etapa del doctorado y llegar a obtener el grado de Doctora no habría sido posible. Espero que tengan mucho éxito en todos sus proyectos siempre.

A todos en general, espero que puedan seguir apoyando a sus estudiantes, que siempre tengan la misma amabilidad con la que me trataron y apoyaron; espero que vengan recompensas y mucho éxito para ustedes.

DEDICATORIA

Si le hubieran preguntado a la Jimena de hace 10 años si tenía pensando hacer una maestría después, un doctorado; les habría dicho que no. Nunca lo había imaginado y sin duda, ha sido una de las experiencias y aventuras más “variadas” de toda mi vida. Porque durante estos años de estudio, pude aprender mucho de la vida, cambiar mucho la forma en la que veía las cosas, aprender académicamente, madurar y valorar todo. En este tiempo pasaron infinidad de cosas buenas (de las que estoy muy agradecida y siempre lo estaré) y otras no tan buenas (que también se agradecen porque te hacen crecer, pero no son fáciles de superar), pero si recuerdo como comenzó todo, fue dejando a Dios las riendas de mi camino, recuerdo que mientras esperaba los resultados de ingreso al doctorado, pensaba: “Si Tú Dios, quieres que ingrese así será”. Solo puedo agradecer y dedicarle este logro totalmente a Dios, porque ha sido quien ha puesto en mi vida a las personas indicadas para apoyarme, ha puesto en mi las fuerzas y la inteligencia necesarias para no rendirme y continuar a pesar de cualquier obstáculo. Si el día de hoy pueden leer esto, es por qué obtuve el grado de Doctora en Ciencias Biológicas principalmente gracias a Dios, porque hasta el último día, tenía dudas sobre si cumpliría los requisitos de titulación y nuevamente fue que pensé: “Sí es Tú deseo que me titule, así será, si no, también lo aceptaré”, y bueno, creo que ya saben cuál fue Su respuesta y el desenlace de esta historia.

De las personas más importantes en mi vida y que Él también me ha dado, son mi familia, mi mamá Beatriz Villarreal y mi hermano Ernesto R. G. Villarreal, gracias también a ellos pude tener esta experiencia; gracias por su paciencia, por su apoyo, por su cariño y por todo lo que me han regalado todos estos años de estudio, soy bendecida de tenerlos, les dedico también este éxito y esta tesis. Los quiero mucho. Como es mi última tesis para obtención de grado, también voy a agradecer y mencionar a Lucas Villarreal, Maggie Villarreal y Lucho Villarreal, gracias porque son mi motivación y mi alegría, siempre los voy a querer.

Finalmente, a los colegas, amigos que estuvieron alguna vez durante el proceso y que puede que aun sigan en mi vida o quizá no, también les agradezco porque algún día pusieron de su granito de arena para que pudiera continuar.

Si hay algo que puedo decir después de estos cuatro años de Doctorado y aproximadamente 7 años de estudio continuo, es: Nunca pierdan la Fe, si Dios quiere, todo es posible.

ÍNDICE GENERAL

PORTADAS.....	1-2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS.....	4
ÍNDICES	5-9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	17
Importancia de la conservación de los anfibios y su papel ecológico.....	19
Importancia de los anfibios en ciencia.....	21
Algunas causas de extinción	23
Enfermedades emergentes y contaminación	24
Comercialización ilegal	25
Microplásticos	27
Patógenos emergentes/enfermedades emergentes	28
Anfibios y <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	29
Origen y expansión	30
Ciclo de infección de Bd	32
Signos en los animales	34
Tratamientos estudiados hasta la fecha.....	35
Importancia de las comunidades microbianas en la piel de anfibios.....	36
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	
Objetivo general	40
Objetivos Particulares.....	40
JUSTIFICACIÓN	40-41
CAPITULO I.....	42

MATERIALES Y MÉTODOS I.....	43
RESULTADOS.....	46
CAPITULO II.	51
MATERIALES Y MÉTODOS II.	52
CAPITULO III.....	97
MATERIALES Y METODOS.....	98
RESULTADOS.....	102
DISCUSIÓN	128
CONCLUSIONES.....	139
PERSPECTIVAS	141
REFERENCIAS	142
ANEXOS	166
DISPONIBILIDAD DE DATOS.....	186

ÍNDICE DE FIGURAS

ANTECEDENTES

Figura 1. Lesiones en animales por patógenos	26
Figura 2. Las familias y especies presentes en la República Mexicana.....	29
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Bd</i>	32
Figura 4. Signos vistos en los animales y mapa de distribución <i>Bd</i>	33
Figura 5. Susceptibilidad observada en salamandras.....	39

CAPÍTULO I.- Estudio de la composición y estructura de la microbiota cutánea en salamandras

Figura 6. Mapa de procedencia de las muestras.	53
Figura 7. Las abundancias a nivel de familia.	59
Figura 8. Abundancias nivel Familia	60
Figura 9. Abundancias nivel Género	61
Figura 10. Matriz de distancias por condición	63
Figura 11. Análisis PCoA (Diversidad beta).....	64
Figura 12. Las abundancias de biomarcadores.....	67
Figura 13. Identificación de biomarcadores ANCOM-BC (familia)	67-68
Figura 14. Identificación de biomarcadores ANCOM-BC (género)	70
Figura 15. Red de microbiota para animales negativos a <i>Bd</i>	72
Figura 16. Red de microbiota para animales positivos a <i>Bd</i>	74
Figura 17 Estructura de las redes: Modularidad.....	77
Figura 18. Comparación Diagrama Venn.....	78
Figura 19. Comparación Diagrama Venn.....	80
Figura 20. Red core para animales positivos y negativos	83
Figura 21. Comparación estadística de diferencias topológicas entre susceptibles y tolerantes	86

Figura 22. Comparación estadística de diferencias topológicas entre susceptibles y tolerantes.	87
Figura 23. Comparación estadística de diferencias topológicas entre tolerantes ...	88-89
Figura 24. Comparación estadística de diferencias topológicas entre tolerantes	90
Figura 25. Análisis de robustez de las redes	92
Figura 26. Comparativa del análisis de robustez de las redes entre susceptibles y tolerantes	94
Figura 27. Comparativa del análisis de robustez de las redes entre grupos tolerantes	96

CAPÍTULO II.- La identificación de patógenos y la búsqueda de dianas terapéuticas

Figura 28. Diferencias en la composición de microorganismos potencialmente patógenos por grupos	104
Figura 29. Alineamiento múltiple	107
Figura 30. 3D modelos de las dianas moleculares	109
Figura 31. Alineamiento múltiple Bd	107
Figura 32. Modelo diana anti-Bd	108

CAPÍTULO III.- El diseño de proteínas terapéuticas, su modelaje estructural y su evaluación

Figura 33. Proceso de construcción proteína anti-Bd	109
Figura 34. Modelo anti-Bd	115
Figura 35. Diagrama construcción del tratamiento	118
Figura 36. Generación de modelos estructurales	120
Figura 37. Construcción de una secuencia con múltiples dianas	125
Figura 38. Ensayo de unión a membranas (BD8LC5)	127
Figura 39. Ensayo de unión a membranas (BD9LC5)	129
Figura 40. Ensayo de unión a membranas (BD12LC5)	130
Figura 41. Acoplamiento final	134

Figura 42. Mecanismo de acción de la proteína tratamiento	140
---	-----

FIGURAS SUPLEMANTARIAS

Figura 1. Abundancias nivel Orden	167
Figura 2. Abundancias nivel Phylum	168
Figura 3. Abundancias y distancias por condición	169
Figura 4. Abundancias y distancias por condición	169
Figura 5. Abundancias y distancias por condición	170
Figura 6. Comparación de distancias	171
Figura 7. Identificación de biomarcadores	172
Figura 8. Estadístico Wald del método ANCOM-BC nivel familia.....	173
Figura 9. Estadístico Wald del método ANCOM-BC nivel género	174
Figura 10. Comparación composición por módulo	175
Figura 11. Red de microbiota para animales negativos y positivos a <i>Bd</i>	176
Figura 12. Comparación topología (susceptibles vs tolerantes II).....	177
Figura 13. Comparación topología (tolerantes)	178
Figura 14. Comparación composición robustez (susceptible vs tolerante II).....	179
Figura 15. Comparación composición robustez (tolerantes II)	179
Figura 16. Indices beta (lugar y especie).....	180
Figura 17. Indices beta (por condición I)	181
Figura 18. Indices beta (por condición II)	181
Figura 19. Indices beta (por condición III).....	182
Figura 20. Comparación composición por módulo I	179
Figura 21. Comparación composición por módulo II.....	179
Figura 22. Comparación composición por módulo III	179
Figura 23. Curvas de rarefacción	186

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Búsqueda de secuencias homologas	48
Tabla 2. Características antimicrobianas del diseño.....	113
Tabla 3. Características antifúngicas	114
Tabla 4. Propiedades de las secuencias diseñadas	115

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Identificación de patógenos oportunistas en la piel de salamandras	166
--	------------

RESUMEN

Las enfermedades fúngicas en anfibios representan una amenaza creciente para la biodiversidad; el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) destaca por su capacidad de infectar a una amplia variedad de especies, con la posibilidad de coinfección, lo que incrementa considerablemente su letalidad. Hasta la fecha no existe un tratamiento eficaz, limitación que podría estar relacionada con la microbiota cutánea de los anfibios, la cual constituye un componente activo de la defensa inmune innata que interactúa con el moco, los péptidos antimicrobianos y otras defensas de la piel, modulando así la respuesta del hospedador. Dado que todos los tratamientos probados son de aplicación externa, comprender la composición, abundancia y estructura de las comunidades bacterianas presentes en la piel en condiciones de salud e infección resulta fundamental para identificar posibles blancos moleculares. Por ello este proyecto comparó la microbiota cutánea de salamandras positivas y negativas a *Bd*, identificó microorganismos candidatos para terapias basadas en proteínas de diseño, y propone un esquema de tratamiento específico orientado a mitigar la infección por *Bd* considerando el papel activo de la microbiota cutánea.

PALABRAS CLAVE: Salamandras, *Bd*, hongos, tratamiento, bacterioma, redes.

ABSTRACT

Fungal diseases in amphibians pose a growing threat to biodiversity; the chytrid fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and is a particularly concerning due to their ability to infect a wide range of host species, with co-infection further increasing their lethality. No effective treatment currently exists, a limitation that may be linked to the cutaneous microbiota of amphibians, which functions as an active component of innate immune defense by interacting with mucus, antimicrobial peptides, and other skin defenses, thereby modulating the host response. Since all treatments tested to date are externally applied, understanding the composition, abundance, and structure of skin bacterial communities under both Healthy and infected conditions is essential for identifying potential molecular targets. This project therefore compared the cutaneous microbiota of *Bd*-positive and *Bd*-negative salamanders, identified candidate microorganisms for protein-based therapeutic approaches, and proposes a targeted treatment framework designed to mitigate *Bd* infection while accounting for the active role of the skin microbiota.

KEYWORDS: Salamanders, *Bd*, fungi, treatment, bacteriome, networks.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades emergentes en animales son cada vez más comunes. Se ha mencionado que, una de las posibles causas está relacionada a aspectos climáticos, que pueden favorecer la proliferación y dispersión de patógenos emergentes (McArthur *et al.*, 2019). Los patógenos emergentes pueden definirse como bacterias, parásitos, virus u hongos capaces de causar enfermedades graves, caracterizados por una alta letalidad y elevadas tasas de infección asociadas a su aparición inesperada en una población (Kilpatrick *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2019). A diferencia de los patógenos ya establecidos, cuya incidencia es conocida y, en muchos casos, tratable, los patógenos emergentes representan una amenaza novedosa para el hospedador, lo que dificulta tanto su control como el desarrollo de tratamientos eficaces (Schilliger *et al.*, 2023).

La primera descripción de brotes de quitridiomycosis causada por *Bd*, asociados a mortalidades masivas fue en 1998, principalmente en Australia y Panamá en anuros silvestres, como por ejemplo *Litoria spp.*, o el género *Dendrobates* y otras ranas neotropicales. *Bd*, posteriormente fue nombrado y aislado en cultivo a partir de anfibios enfermos a finales de los años 90, trabajos como el de Longcore *et al.*, 1999, han sido citados como su origen (Mulder *et al.*, 2024).

Hasta la fecha, no se cuenta con registros actualizados sobre la dispersión global de la del hongo quítrido *Bd*. Al revisar la información disponible, se observa una notable heterogeneidad en los reportes de detección de *Bd* a nivel mundial (Martel *et al.*, 2013). En un inicio, hacia 2014, la infección parecía concentrarse en regiones específicas de Estados Unidos; sin embargo, la actualización más reciente —que compila datos obtenidos entre 2019 y 2021— revela un aumento en la detección dentro de ese país y una extensión considerable del patógeno hacia otras regiones, incluyendo México, diversos países de América del Sur, Europa, Asia, África e incluso Oceanía (Van Rooij *et al.*, 2015; Olson *et al.*, 2021).

Este hongo ha provocado la disminución demográfica de al menos 501 especies de anfibios y ha contribuido a la extinción documentada de alrededor de 90 especies (Van Rooij *et al.*, 2015). Su impacto se debe a que afecta y deteriora de manera crítica la piel, órgano

fundamental para procesos fisiológicos esenciales en los anfibios, como la osmorregulación y el intercambio de gases (Pereira *et al.*, 2013; Lorch *et al.*, 2016). La alteración de estas funciones conduce, en numerosos casos, a un fallo sistémico irreversible y, finalmente, a la muerte de los organismos afectados (Campbell *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022; Schilliger *et al.*, 2023).

La expansión global de *Bd* se ha visto favorecida por el comercio ilegal de anfibios y por la persistencia del patógeno en múltiples cuerpos de agua, donde las zoosporas pueden mantenerse viables y actuar como fuentes de infección. Bajo estas condiciones, cualquier individuo que entre en contacto con ambientes contaminados—o con otros organismos ya infectados—queda expuesto y vulnerable a la transmisión del patógeno (Fisher *et al.*, 2009; Van Rooij *et al.*, 2015).

Actualmente, no se dispone de un tratamiento efectivo y universalmente aplicable para las quitridiomycosis. Entre las estrategias exploradas se encuentran las terapias probióticas, orientadas a revertir o mitigar la infección mediante la inoculación de microorganismos benéficos derivados del microbioma cutáneo de especies de anfibios que muestran infecciones persistentes, pero no letales (Harris *et al.*, 2009; Jani *et al.*, 2018). No obstante, la eficacia de estas aproximaciones ha sido limitada: su implementación no ha logrado reproducirse de manera consistente ni exitosa a lo largo de las distintas especies evaluadas, lo que evidencia una marcada especificidad huésped-microbioma y la complejidad de las interacciones ecológicas involucradas (Muletz *et al.*, 2012; Becker *et al.*, 2015; Kueneman *et al.*, 2014; Gajewski *et al.*, 2023).

De manera paralela, también se han ensayado diversos tratamientos químicos con la finalidad de reducir la carga patógena o eliminar al hongo del hospedero; como, por ejemplo, la acción fungicida de desinfectantes como hipoclorito, permanganato, formalina, etanol, Virkon, compuestos de amonio cuaternario, con los cuales se logró definir un protocolo de desinfección de superficies, fómites, equipos en el manejo de anfibios (Johnson *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2010). Sin embargo, estos esfuerzos tampoco han generado los resultados esperados, ya sea por su eficacia limitada, su potencial toxicidad, efectos agresivos al

hospedero, o por la imposibilidad de aplicarlos a gran escala en condiciones naturales (Johnson *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2010).

También se han probado algunos tratamientos físicos, como, por ejemplo, la inoculación de probióticos para el hospedador o cepas microbianas productoras de compuestos anti-*Bd* (Flechas *et al.*, 2012; Niederle *et al.*, 2019); así como las terapias de calor, las cuales consisten en la aplicación directa de calor a los hospederos, para que con el tiempo se pueda disminuir o eliminar la carga del patógeno en la piel del hospedero (Hettyey *et al.*, 2019; Kásler *et al.*, 2025). Pero, al igual que otros tratamientos —como los químicos—, no han sido exitosos a largo plazo, la infección vuelve y en algunos casos, la letalidad también. Algunas de las causas documentadas del fracaso de este tipo de tratamientos son: el rechazo a la inoculación probiótica, la diversidad bacteriana tiende a volver a un “*equilibrio*” o a su estado “*inicial*” (Kearns *et al.*, 2017) Así como que se ha estudiado la resistencia-tolerancia de las cepas del hongo *Bd* a las altas temperaturas (Voyles *et al.*, 2017).

Las causas de la variabilidad observada en la eficacia terapéutica son diversas y multifactoriales. No obstante, existen algunas evidencias que indican que la composición inicial de la microbiota del hospedero constituye uno de los factores más determinantes para el éxito o fracaso de un tratamiento. Diversos estudios en humanos han demostrado que los microorganismos asociados al hospedero pueden alterar de manera significativa la farmacocinética de diversos compuestos, modificando su distribución tisular, su biotransformación e incluso su absorción (Vanhoefer *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 2012; Kuznetzova *et al.*, 2017). Estos hallazgos derivan, en gran medida, de estudios clínicos y experimentales en diversos tipos de cáncer, donde se ha observado que numerosos fármacos empleados en quimioterapia son metabolizados por la microbiota del paciente antes de alcanzar su blanco terapéutico (Vanhoefer *et al.*, 2001). Este metabolismo previo puede generar metabolitos secundarios con efectos tóxicos o, alternativamente, reducir la biodisponibilidad del compuesto activo, impidiendo que se alcance la dosis efectiva necesaria para ejercer su función antitumoral (Clemente *et al.*, 2012). En particular, se ha documentado que bacterias pertenecientes a géneros como *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Eubacterium* participan en estos procesos, induciendo efectos adversos que comprometen de manera

significativa la eficacia del tratamiento (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017; Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022).

Un caso particularmente ilustrativo es el del irinotecán (CPT-11), un fármaco fundamental en el tratamiento del cáncer colorrectal (CCR) y de su forma metastásica (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017). Si bien, el incremento de la dosis podría, en principio, potenciar su eficacia terapéutica, esta estrategia resulta inviable debido a que la interacción del compuesto con la microbiota intestinal del paciente desencadena diarrea severa (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017). Esta toxicidad gastrointestinal no solo compromete rápidamente el estado clínico del paciente, sino que también limita de manera directa el beneficio terapéutico del fármaco (Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022). De forma análoga, interacciones entre microbiota y fármacos que alteran su eficacia o generan efectos adversos han sido reportadas también en estudios realizados con anfibios, lo que sugiere que este fenómeno podría ser un rasgo generalizable entre distintos grupos de vertebrados (Li *et al.*, 2019a; Li *et al.*, 2019b; Hu *et al.*, 2022).

La microbiota residente no solo puede modular la eficacia de los tratamientos químicos, además desempeña un papel determinante en el éxito —o fracaso— de las terapias probióticas. Diversos estudios han documentado varios mecanismos mediante los cuales la comunidad microbiana nativa influye en estos tratamientos (Di Gioia *et al.*, 2020; Gowen *et al.*, 2023; Ng *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2025). Entre ellos destacan:

1. El incremento en la resistencia a antibióticos, derivado de la formación de nuevos biofilms resultantes de interacciones entre microorganismos residentes y aquellos introducidos;
2. La generación de efectos benéficos únicamente transitorios, producto de cambios no sostenidos en la composición microbiana a largo plazo;
3. La baja persistencia de las especies benéficas implantadas, cuya colonización suele ser inestable o efímera;

4. La necesidad de tratamientos probióticos prolongados, debido a la fuerte resistencia ecológica ejercida por la microbiota residente frente a la incorporación de nuevos taxones; y
5. La marcada dependencia de la eficacia terapéutica respecto a la composición microbiana inicial del hospedero, lo que introduce una fuerte variabilidad interindividual en los resultados.

En conjunto, estos factores convierten la implantación exitosa de una microbiota benéfica en un desafío significativo para el diseño y aplicación de terapias probióticas efectivas (Di Gioia *et al.*, 2020; Gowen *et al.*, 2023; Ng *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2025).

La composición microbiana de la piel puede interferir de manera significativa en la colonización de los microorganismos introducidos con fines terapéuticos, restringiendo su establecimiento y, en consecuencia, su capacidad para contribuir a la reversión de la infección en individuos humanos afectados (Paetzold *et al.*, 2019; Frerejacques *et al.*, 2020; Scharschmidt & Segre, 2025) y también en algunos animales (Küng *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2023). Estas variaciones en la estructura de la comunidad microbiana tienen implicaciones profundas en la respuesta inmunológica del hospedero, debido a que influyen tanto en la activación de mecanismos de defensa como en la variabilidad en la susceptibilidad frente al patógeno en anfibios (Küng *et al.*, 2014; Gajewski *et al.*, 2023). Como resultado, se observan diferencias marcadas en el desenlace clínico, que pueden abarcar desde infecciones subletales hasta un deterioro acelerado que culmina en la muerte del organismo (Gajewski *et al.*, 2023).

En consecuencia, en anfibios, la letalidad de la enfermedad no es homogénea, sino que depende de factores múltiples, entre ellos la composición inicial de la microbiota (Jiang *et al.*, 2025), la especie de hongo quitridiomyceto implicada (Basanta *et al.*, 2022), así como las condiciones geográficas y climatológicas del ambiente en el que habita el huésped (García-Rodríguez *et al.*, 2022).

La evidencia disponible en humanos y en animales, muestra que, incluso cuando se encuentran en bajas abundancias, ciertas bacterias potencialmente patógenas presentes en la microbiota pueden facilitar la colonización por otros agentes infecciosos y aumentar tanto la

gravedad como la letalidad de enfermedades emergentes (Young *et al.*, 2017). Esto puede ocurrir aun cuando dichas bacterias, por sí solas, no sean capaces de inducir enfermedad en organismos considerados clínicamente sanos (Stevens *et al.*, 2021). Este fenómeno — documentado en el contexto de infecciones bacterianas y fúngicas— subraya la importancia de examinar de manera integral las interacciones entre la microbiota y los patógenos, dado su papel determinante en la evolución, progresión y severidad de múltiples enfermedades infecciosas (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2021; Tewari & Dey, 2024).

Se han identificado diversos tipos de eventos que pueden facilitar interacciones sinérgicas entre la microbiota y patógenos, potenciando la colonización, persistencia o virulencia de infecciones emergentes:

- 1) Transición de bacterias comensales a patógenas.

Numerosos estudios han demostrado que bacterias consideradas originalmente como comensales pueden adquirir un comportamiento patógeno cuando las condiciones ambientales o fisiológicas del hospedero se vuelven favorables para ello (Stevens *et al.*, 2021). Factores como alteraciones en el entorno, la presencia de una infección emergente, estados de inmunosupresión o la disrupción de la microbiota residente pueden facilitar su expansión (Young *et al.*, 2017). Este proceso, a su vez, incrementa la letalidad de infecciones causadas por patógenos primarios (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2021; Tewari & Dey, 2024).

- 2) Interacciones metabólicas y ecológicas entre la microbiota residente y los patógenos.

Las bacterias residentes no requieren ser comensales ni patógenas para influir en la dinámica de una infección; basta con que produzcan metabolitos secundarios o modifiquen el microambiente de forma que favorezca la invasión o persistencia de un patógeno (Stevens *et al.*, 2025). *Candida albicans*, por ejemplo, puede explotar recursos generados por la microbiota residente para facilitar su invasión, incrementando así la severidad de la infección (Santus *et al.*, 2021; Stevens *et al.*,

2021). Fenómenos semejantes han sido documentados para *Staphylococcus aureus* (Will *et al.*, 2025; Stevens *et al.*, 2025).

3) Eventos de evolución adaptativa.

La evolución microbiana puede desempeñar un papel determinante: bacterias que actualmente se comportan como comensales con baja patogenicidad pueden adquirir mutaciones o elementos genéticos móviles —como plásmidos— que aumenten su virulencia bajo circunstancias específicas. Estas innovaciones pueden contribuir significativamente a la gravedad de una infección (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2025).

A pesar de los avances en otros sistemas biológicos, aún se requieren estudios exhaustivos que exploren la relación microbiota–patógeno en el contexto de *Bd* (Stevens *et al.*, 2025). Determinar si estas formas de interacción —transiciones comensal–patógeno, facilidades metabólicas o adaptaciones evolutivas— influyen en la invasión, severidad o letalidad asociada a *Bd* en anfibios constituye un área de investigación de alta prioridad.

Las salamandras representan uno de los grupos de anfibios más susceptibles a *Bd* y a *Bsal*; sin embargo, los estudios que abordan la infección por estos patógenos en este grupo en particular han sido moderadamente escasos en comparación con otros anfibios (Vázquez *et al.*, 2009, Bauer *et al.*, 2018). Esto resulta relevante considerando que, si bien *Bd* presenta el mayor número de detecciones documentadas, a pesar de que, *Bsal* es el patógeno específico de salamandras, ambos representan una amenaza significativa para estas poblaciones (Novotny *et al.*, 2024). No obstante, se ha demostrado que *Bd* también puede ejercer efectos letales en numerosas especies de salamandras susceptibles, como, por ejemplo, *Plethodon metcalfi*, con un 75% de mortalidad (Vázquez *et al.*, 2009), *Cryptobranchus alleganiensis* con un 33% de mortalidad (Novotny *et al.*, 2024) y en *Aneides aeneus* (Bauer *et al.*, 2018), por lo que su papel en la dinámica epidemiológica de estos organismos no debe subestimarse.

La conservación de las salamandras y de los ecosistemas que habitan es de particular importancia debido a las funciones ecológicas que desempeñan (Young *et al.*, 2007). Estos

anfibios contribuyen al equilibrio de las comunidades biológicas regulando el tamaño de poblaciones de insectos y controlando la presencia de plagas potencialmente dañinas para el ecosistema (Young *et al.*, 2007; Kilpatrick *et al.*, 2010). Además, su actividad depredadora beneficia directamente a las comunidades humanas cercanas a cuerpos de agua, porque ayudan a disminuir la abundancia de mosquitos vectores de enfermedades como dengue, malaria y zika (Kilpatrick *et al.*, 2010). Esta reducción natural de vectores permite disminuir el uso de pesticidas, los cuales no solo afectan de manera negativa a los propios anfibios, sino también al entorno que habitan (Raghavendra *et al.*, 2008; Dambach, 2020).

Dado que las diferencias en la composición microbiana de la piel de los anfibios han sido ampliamente documentadas en múltiples especies (Gervasi *et al.*, 2013; Bradley *et al.*, 2019; Sette *et al.*, 2020; Carter *et al.*, 2021; Hardman *et al.*, 2023; Wan *et al.*, 2024; Osborne *et al.*, 2024), es razonable plantear la hipótesis de que existe una red de microorganismos “core” — es decir, un conjunto microbiano central— presente tanto en salamandras infectadas con *Bd* como en individuos considerados clínicamente sanos (Wan *et al.*, 2024; Osborne *et al.*, 2024). La inferencia de estas redes fundamentales, así como el análisis detallado de la composición y estructura de la microbiota cutánea, puede proporcionar información clave sobre las interacciones que ocurren entre la comunidad microbiana residente y el patógeno.

En particular, comparar la microbiota de animales de la misma especie que se encuentran dentro o fuera de un proceso infeccioso permitirá identificar diferencias ecológicas y funcionales relevantes. Este enfoque no solo es útil para comprender la dinámica de la infección, sino que también resulta crucial para detectar posibles mecanismos de resistencia a la colonización por microorganismos probióticos. Asimismo, puede permitir la identificación de taxones microbianos claves asociados con la susceptibilidad o resistencia al *Bd*, los cuales podrían constituir objetivos estratégicos para el desarrollo de terapias más eficaces y con menos limitaciones.

El presente trabajo pretende estudiar la microbiota cutánea de tres especies de salamandras, que, por un lado, presentan un estado de salud favorable y por otro, salamandras que se encuentran en un proceso de infección causado por *Bd*, el cual ha sido detectado. Mediante

un enfoque bioinformático integral doble que involucra primero, análisis clásicos para determinar la composición, abundancia, estructura y robustez de las comunidades bacterianas, así como la detección de patógenos presentes, y segundo, el desarrollo de un método *in silico* a través del cual diseñar de manera práctica, una proteína con múltiples objetivos microbianos, que potencialmente permitirá la reestructuración de la microbiota cutánea de animales con disbiosis a causa de la infección por el hongo *Bd*. Esperando que dicha reestructuración, permita restaurar el equilibrio en la microbiota y pueda ser una proteína tratamiento que pueda coadyuvar a los tratamientos implementados en la actualidad para potenciar y/o permitir sus efectos.

ANTECEDENTES

CONTEXTO GLOBAL: CRISIS DE BIODIVERSIDAD

Importancia ecológica y conservación de los anfibios

La conservación de los anfibios y de los ecosistemas que habitan es de alta prioridad ecológica, debido a que estos organismos desempeñan funciones clave en múltiples niveles tróficos (Kilpatrick *et al.*, 2010). Los anfibios, como depredadores intermedios, contribuyen significativamente al control de poblaciones de insectos, incluidas especies consideradas plagas o vectores de enfermedades de relevancia biomédica, como dengue, malaria o zika (Kilpatrick *et al.*, 2010; Pabijan *et al.*, 2020). Esta función ecosistémica tiene implicaciones directas no solo para la salud ambiental, sino también para la salud pública, particularmente en comunidades humanas cercanas a los cuerpos de agua donde los anfibios se reproducen (Pabijan *et al.*, 2020).

En el contexto actual, la búsqueda de alternativas al uso de pesticidas químicos se vuelve urgente, porque estos compuestos afectan negativamente no solo la supervivencia de los anfibios, sino también la calidad del suelo y los ciclos ecológicos asociados (Wolmarans *et al.*, 2020). En sus fases larvales, muchos anfibios se alimentan de algas y materia orgánica en cuerpos de agua, lo cual contribuye al mantenimiento del equilibrio ecológico al evitar proliferaciones algales excesivas que pueden generar zonas hipóxicas (Mathwin *et al.*, 2021). Cuando las algas forman capas densas que limitan la penetración de la luz solar, se compromete la fotosíntesis de otras especies acuáticas y se reduce la oxigenación del agua, afectando severamente la biodiversidad local (Mathwin *et al.*, 2021; Steigerwald *et al.*, 2024). Así, los anfibios no sólo funcionan como controladores biológicos de insectos, sino también como reguladores del equilibrio limnológico y de la calidad del agua (Steigerwald *et al.*, 2024).

Desafíos para la conservación de los anfibios

Los anfibios —que incluyen ranas, sapos, salamandras y cecilias— constituyen uno de los grupos vertebrados más amenazados a nivel global (Ver Figura 1). Su declive se atribuye principalmente a la degradación y fragmentación de hábitats, la contaminación de cuerpos de agua, el cambio climático, la comercialización ilegal y la caza no regulada (Galindo-Bustos *et al.*, 2014). En paralelo, diversos patógenos emergentes han expandido su rango geográfico y su espectro de hospederos susceptibles, favorecidos por cambios ambientales de origen antropogénico, lo cual ha resultado en brotes epidémicos con altos niveles de mortalidad (Pabijan *et al.*, 2020).

Los anfibios están sometidos a una presión simultánea de factores bióticos y abióticos (Nnadi & Carter, 2021). La alteración de ecosistemas acuáticos y terrestres por contaminantes químicos, incremento de temperaturas, eutrofización, microplásticos y eventos climáticos extremos han modificado las condiciones ecológicas bajo las cuales evolucionaron estas especies (McArthur, 2019; Tornabene *et al.*, 2021). Estos cambios también favorecen la emergencia de patógenos oportunistas que afectan una amplia gama de organismos, incluyendo plantas, insectos, reptiles, murciélagos y, con especial severidad, anfibios (Wilson *et al.*, 2017; Hoyt *et al.*, 2019; Verbrughe *et al.*, 2019; Origi *et al.*, 2022).

La comercialización y el tráfico ilegal de anfibios contribuyen no solo a la pérdida directa de individuos, sino también a la diseminación global de patógenos. Animales extraídos de su ambiente natural adquieren microbiotas alteradas, quedan expuestos a nuevas enfermedades y actúan como vectores biológicos que facilitan la colonización de patógenos en nuevas regiones y especies (Galindo-Bustos *et al.*, 2014). Actividades humanas aparentemente inocuas, como el turismo en áreas naturales, pueden introducir microorganismos exóticos a través del calzado o el contacto con cuerpos de agua, como se ha documentado en la propagación del hongo *Pseudogymnoascus destructans* en murciélagos (Li *et al.*, 2022). Estudios recientes han comenzado a documentar los efectos de contaminantes emergentes, como nanoplásticos y microplásticos, sobre las distintas etapas de desarrollo de los anfibios. Se ha observado que estos contaminantes pueden ser absorbidos por la piel o ingeridos,

provocando disminución en la viabilidad de los huevos de forma dosis-dependiente, así como malformaciones en cola, aparato digestivo y estructuras cefálicas, edema ventral y alteraciones en la pigmentación (Araújo *et al.*, 2021). También se han reportado cambios en la expresión de genes clave durante el desarrollo embrionario y en marcadores asociados a la migración de la cresta neural, lo que sugiere efectos subletales que podrían comprometer la aptitud a largo plazo (Araújo *et al.*, 2021).

Lamentablemente, los anfibios se encuentran sometidos a múltiples presiones antropogénicas y ambientales que comprometen su supervivencia. En consecuencia, y sumado al impacto de enfermedades emergentes como la quitridiomycosis, un número considerable de especies de anfibios en México ha sido incluido en las listas rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), muchas de ellas categorizadas en los niveles de mayor preocupación por su alto riesgo de extinción (Mendoza *et al.*, 2015; Van Rooij *et al.*, 2015; Basanta *et al.*, 2021; Basanta *et al.*, 2022).



Taxa	🌐 Familias	Familias	🌐 Especies	Especies
Anura	54	11	6333	242
Caudata	10	4	655	137
Gymnophiona	10	1	199	2

Figura 1. Las familias y especies presentes en la República Mexicana. En la parte superior de la figura, se muestran los cuatro tipos de anfibios que existen, de izquierda a derecha, las salamandras, sapos, ranas y gimnofiones. Posteriormente, en la parte central de la figura, se muestra un mapa de la república mexicana y el número de especies de anfibios presente en

cada estado. Finalmente, en la parte inferior de la figura, se encuentra una tabla que indica el número de Familias de anfibios presentes a nivel mundial y dentro del país, así como el número de especies de anfibios a nivel mundial y en el país. **Nota.** Fuente: Elaboración propia. Mapa y fotos modificadas de internet.

Importancia de los anfibios en la ciencia y la biotecnología

Aunque su papel ecológico es ampliamente reconocido, los anfibios también representan un recurso de enorme valor para el desarrollo científico y biomédico (Mendoza *et al.*, 2015). Diversas investigaciones han demostrado que estos organismos producen una amplia gama de compuestos bioactivos con potencial farmacológico, lo que los ha posicionado como modelos clave en biotecnología y medicina traslacional (Tyler *et al.*, 1983).

Un caso emblemático es el de *Rheobatrachus silus*, una rana australiana actualmente extinta. Esta especie presentaba un comportamiento reproductivo único: las hembras mantienen a sus crías dentro del estómago, inhibiendo temporalmente la producción de jugos gástricos para evitar la digestión de los embriones (Tyler *et al.*, 1983). Para ello, secretaban una sustancia mucosa que protegía eficazmente las paredes gástricas (Corben *et al.*, 1974; Tyler *et al.*, 1983). El estudio de este mecanismo inspiró el desarrollo de fármacos protectores de la mucosa estomacal, entre ellos la ranitidina, utilizada durante décadas en medicina humana y veterinaria para tratar gastritis y reflujo ácido (Mendoza *et al.*, 2015).

Además de este ejemplo, otras especies de ranas, salamandras e incluso ajolotes han contribuido significativamente a la investigación científica en diversas áreas. Los ajolotes (*Ambystoma mexicanum*), por ejemplo, son modelos excepcionales en los estudios de regeneración de extremidades y tejidos complejos, aportando información clave sobre mecanismos celulares y genéticos de reparación tisular (Dwaraka & Voss, 2021). Asimismo, numerosas especies de anfibios producen péptidos antimicrobianos en su piel, cuya caracterización ha abierto nuevas vías en la búsqueda de antibióticos alternativos frente al

incremento de resistencias bacterianas (McMillan & Coombs, 2020; García *et al.*, 2024). El estudio de la metamorfosis en salamandras y anuros también ha proporcionado modelos únicos para comprender procesos hormonales y la influencia de factores abióticos y bióticos en el desarrollo, ofreciendo información relevante para la biología del desarrollo y la endocrinología comparada (Brown & Cai, 2007).

PATÓGENOS EMERGENTES: UNA AMENAZA GLOBAL

Infecciones emergentes causadas por patógenos en animales

Las enfermedades emergentes en animales están incrementando su aparición con el tiempo, ver Figura 2 (McArthur *et al.*, 2019). Los eventos climáticos que alteran aspectos como la temperatura, humedad y pH de una región geográfica, pueden otorgar las condiciones óptimas de crecimiento de patógenos que son capaces de causar enfermedades nuevas y, por lo tanto, de gravedad en cualquier hospedero (McArthur *et al.*, 2019).

Este cambio en las condiciones climáticas, no solamente está afectando a los microorganismos residentes del suelo y el agua; también es capaz de inducir un estado de estrés continuo en ciertos animales expuestos, lo que tiene como resultado un cambio en su sistema inmune, una supresión que puede brindar las condiciones ideales para patógenos emergentes, los cuales no podrán ser identificados inmediatamente por las defensas primarias -como lo son la microbiota residente o la producción directa o indirecta de AMP's (*Antimicrobial Peptides*) ni respuestas secundarias del hospedero -que involucran a la inmunidad adaptativa o adquirida (Lorch *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022; Schilliger *et al.*, 2023).

El resultado son defensas incapaces de atacar al patógeno, por lo tanto, una mayor facilidad en la colonización y crecimiento del mismo; y finalmente, un hospedero con signos de enfermedad que evolucionan rápido, acelerando el descenso del hospedero (Lorch *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2019). Por eso el estudio de los patógenos emergentes ha adquirido gran interés; por su potencial para provocar la extinción de varias especies en lapsos cortos

de tiempo (Lorch *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022; Schilliger *et al.*, 2023).

Todos los animales pueden ser vulnerables ante la aparición de un patógeno emergente, pero, estas infecciones han sido mayormente descritas en iguanas, camaleones, geckos, serpientes, murciélagos, ranas y salamandras (Lemieux-Labonté *et al.*, 2020; Hoyt *et al.*, 2019). Además de que se puede observar una tendencia en los registros de esta problemática, que nos indica que son causadas por hongos principalmente (Lemieux-Labonté *et al.*, 2020; Hoyt *et al.*, 2019; Lorch *et al.*, 2016; Origgi *et al.*, 2022). En la literatura hay varios ejemplos de patógenos que podríamos citar, entre ellos, el hongo *Ophidiomyces ophiodiicola*, conocido como (SFD), que es el agente patógeno causal de la dermatitis y posterior enfermedad multisistémica vista tanto en serpientes silvestres como serpientes que viven en cautiverio (Lorch *et al.*, 2016; Origgi *et al.*, 2022).

Además, el caso de mayor interés para este trabajo, debido a similitudes puntuales con el modelo de estudio aquí analizado; es el síndrome de nariz blanca (SNB), esta infección es nueva y recurrente en los murciélagos durante su periodo de hibernación (Lemieux-Labonté *et al.*, 2020). Es una enfermedad causada por el hongo *Pseudogymnoascus destructans*. Desafortunadamente, no pudo ser identificado antes de que causara la muerte a gran escala de murciélagos en América durante el año 2006 (Lemieux-Labonté *et al.*, 2020).

El SNB ha sido tratado con antimicóticos como el Itraconazol y el Ketoconazol; además, que se han probado distintos tratamientos probióticos, que han logrado identificar a una bacteria de importancia en la salud de los murciélagos; *Pseudomonas fluorescens*, que tiene un efecto positivo importante durante la mitigación de la infección (Hoyt *et al.*, 2019).



Figura 2. Las lesiones en los animales que son ocasionadas por patógenos emergentes. Se muestran varias imágenes del daño causado debido a infecciones por hongos en distintos animales: ranas, salamandras, murciélagos, iguanas, serpientes, peces, geckos y camaleones. *Nota.* Fuente: Elaboración propia, fotografías modificadas de internet – créditos a quién corresponda.

***B. dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* y su especificidad de hospedero**

A pesar de que se han documentado brotes de quitridiomycosis en anfibios alrededor del mundo, se ha demostrado que *Bd* no es el único patógeno capaz de causar esta enfermedad (Yap *et al.*, 2017). En particular, *Bsal* ha sido identificado como un agente etiológico adicional, responsable de episodios de infección en salamandras, incluidos algunos casos reportados en ranas y sapos (Yap *et al.*, 2017; Towe *et al.*, 2021).

De manera notable, se ha demostrado que, bajo determinadas condiciones ambientales, la rana *Osteopilus septentrionalis* puede presentar una alta susceptibilidad a la infección por *Bsal* (Yap *et al.*, 2017). Este hallazgo pone de manifiesto que las condiciones ambientales

desempeñan un papel fundamental en la emergencia y dispersión de este tipo de patógenos, y evidencia además la plasticidad de los factores de virulencia que caracterizan a estos hongos quitridiomycetos, los cuales pueden facilitar la colonización de hospederos distintos a aquellos considerados primarios (Towe *et al.*, 2021).

Origen y expansión de la infección

La enfermedad infecciosa que afecta a los anfibios y que es causada por el hongo *B. dendrobatidis* fue observada y descrita por primera vez a finales del siglo XX (O’Hanlon *et al.*, 2018). Los primeros reportes documentados corresponden a Australia, donde en 1998 se detectaron lesiones cutáneas compatibles con quitridiomycosis en cadáveres de ranas, lo que permitió reconocer la presencia de un agente patógeno previamente desconocido (Longcore *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2001; O’Hanlon *et al.*, 2018). Estos hallazgos iniciales marcaron el inicio del reconocimiento de una enfermedad emergente con consecuencias sin precedentes para las poblaciones de anfibios a nivel global (Nichols *et al.*, 2001).

La identificación genética del hongo y su descripción formal como una especie nueva ocurrieron en 1999 (Longcore *et al.*, 1999), lo que permitió avanzar en la caracterización de su biología, patogenicidad y distribución (Scheele *et al.*, 2019). Posteriormente, en 2008, *Bd* fue catalogado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) como un patógeno de alto riesgo para la fauna, debido a su elevada capacidad de dispersión y a las altas tasas de mortalidad asociadas a la infección (Fisher *et al.*, 2009). Desde entonces, ésta quitridiomycosis se ha expandido de manera acelerada en amplias regiones del planeta, un proceso que ha sido facilitado principalmente por la comercialización y el transporte global de anfibios, tanto con fines comerciales como científicos y recreativos (Fisher *et al.*, 2009; Scheele *et al.*, 2019).

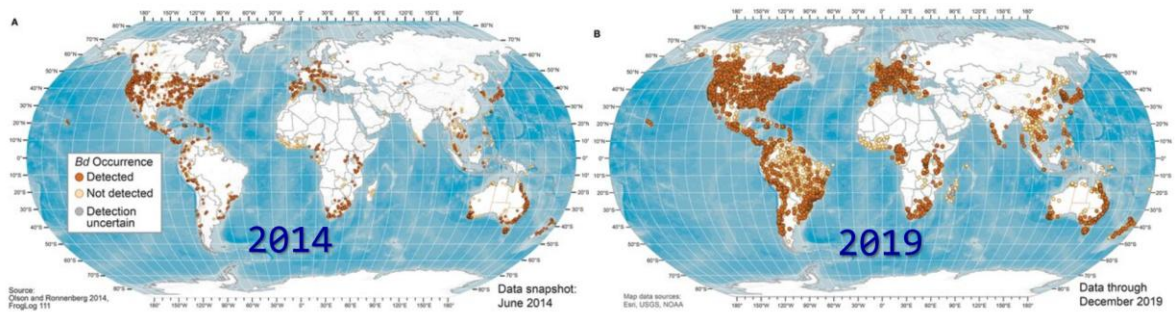
A la fecha, el origen de *Bd* sigue siendo objeto de debate. No obstante, múltiples estudios han propuesto a Asia como la región de distribución primigenia del patógeno, identificándose como un punto clave en la dispersión global de al menos cinco linajes genéticos distintos del hongo (Fisher *et al.*, 2009; Sewell *et al.*, 2021). Esta diversidad genética sugiere una historia evolutiva compleja, en la que ciertos linajes habrían coexistido de manera endémica con sus

hospederos, mientras que otros adquirieron características que facilitaron su expansión global y elevada virulencia (Sewell *et al.*, 2021).

Distribución mundial de *B. dendrobatidis*

Los registros disponibles sobre la detección y expansión de la infección por *Bd* no han sido obtenidos de manera continua ni sistemática a escala global (Martel *et al.*, 2013). Idealmente, se contarían con reportes periódicos —al menos anuales— que permitieran evaluar con precisión la dinámica espacio-temporal del patógeno (Olson *et al.*, 2021). Sin embargo, la información actualmente disponible se limita, en gran medida, a análisis comparativos de su distribución mundial entre los años 2014 y 2019 (Ver Figura 3). Estos datos evidencian un incremento preocupante tanto en la extensión geográfica de la infección como en el número de casos positivos detectados a nivel global (Martel *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2021).

Aunque la distribución actual de *Bd* no se conoce con exactitud, no resulta arriesgado suponer que la situación podría ser aún más crítica en años recientes (Olson *et al.*, 2021). Esta inferencia se sustenta en la capacidad del hongo para persistir en el ambiente mediante zoosporas viables en superficies y cuerpos de agua, lo que facilita su dispersión continua y dificulta su erradicación (Martel *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2021). La ausencia de monitoreos globales actualizados limita la evaluación precisa del riesgo actual y subraya la necesidad de enfoques complementarios que permitan anticipar escenarios futuros de propagación (Martel *et al.*, 2013).



Martel *et al.*, 2013, Olson *et al.*, 2021 y Pascale van Rooij *et al.*, 2015

Figura 3. Distribución mundial de la infección (*Bd*). Se muestran la más reciente distribución del hongo *Bd*. Los puntos rojos representan los sitios en donde ha sido detectado el hongo, amarillo no detectado y gris donde no hay datos. Se hace una comparación con entre los años A) 2014 y B) 2019. *Nota.* Fuente: Elaboración propia. Imágenes de: A. Martel & F. Pasmans (Ghent University), UTIA Bsal Project, Martel *et al.*, 2013, Olson *et al.*, 2021 y Pascale van Rooij *et al.*, 2015, todas vía búsqueda Google.

EL CASO PARTICULAR: *B. DENDROBATIDIS* EN MÉXICO

B. dendrobatidis en México

En el contexto de México, esfuerzos recientes de muestreo y detección dirigidos específicamente a la cepa *Bsal* han indicado, de manera alentadora, que este patógeno aún no se encuentra distribuido en el país ni en ninguna parte del continente americano (Basanta *et al.*, 2022; Olson *et al.*, 2024). En contraste, *Bd* ha sido ampliamente reportado en diversas regiones del territorio nacional. Estudios epidemiológicos han identificado que al menos 41 especies de anfibios, de un total de 103 individuos muestreados, presentan vulnerabilidad a la infección por *Bd* (Basanta *et al.*, 2021).

Los estados de la República Mexicana en los que se ha documentado la presencia de *Bd* incluyen Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Sonora, Estado de México, Morelos, Baja California, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz e Hidalgo, afectando principalmente a especies de anuros y caudados (Mendoza *et al.*, 2015). Esta situación resulta particularmente alarmante, porque muchas de estas regiones albergan una alta riqueza de especies endémicas, lo que incrementa el riesgo de pérdidas irreversibles de biodiversidad asociadas a la quitridiomycosis (Mendoza *et al.*, 2015; Van Rooij *et al.*, 2015; Basanta *et al.*, 2021; Basanta *et al.*, 2022).

De acuerdo con datos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) publicados en 2010, el territorio mexicano alberga más de 376 especies de anfibios, lo que posiciona a México como el quinto país con mayor diversidad de anfibios a nivel mundial (Rollins-Smith & Le Sage, 2021). Esta riqueza no se limita únicamente a ranas, sapos y salamandras, sino que incluye también grupos menos conocidos, como los gimnofiones y especies emblemáticas como los ajolotes (Ribas *et al.*, 2022). En este contexto, la presencia de *Bd* y la potencial introducción de *Bsal* resultan particularmente preocupantes, no solo por su elevada capacidad infectiva y alta letalidad, sino también por su potencial para generar coinfecciones que podrían exacerbar la severidad de la enfermedad y acelerar el colapso de poblaciones vulnerables (Ossiboff *et al.*, 2019; McDonald *et al.*, 2020; Rollins-Smith & Le Sage, 2021; Ribas *et al.*, 2022).

Transmisibilidad y ciclo de vida de *B. dendrobatidis*

A la fecha, se reconoce que los cuerpos de agua asociados a poblaciones de anfibios susceptibles constituyen los principales reservorios y focos de infección para la transmisión de la enfermedad causada por *Bd* (Kriger & Hero, 2007). El ambiente acuático representa un componente esencial del hábitat de los anfibios, muchas de las especies albergan ahí a la totalidad o gran parte de sus etapas larvarias durante su ciclo de vida (Kolby *et al.*, 2015). Esta estrecha dependencia explica, en parte porqué la infección por *Bd* se origina se manifiesta con mayor severidad en determinadas especies, particularmente en anuros con

ciclos de vida altamente ligados a ambientes acuáticos (Johnson & Speare, 2003; Kriger & Hero, 2007; Kolby *et al.*, 2015).

Uno de los aspectos más relevantes en la epidemiología de *Bd* es la diversidad de organismos que pueden participar en su transmisión (Brannelly *et al.*, 2017). Se ha documentado la existencia de hospederos portadores que forman parte del espectro conocido de especies susceptibles y que pueden presentar signos clínicos evidentes de la infección (McMahon *et al.*, 2013). Sin embargo, también se han identificado individuos que, aun estando infectados, no manifiestan síntomas aparentes, lo que sugiere la presencia de mecanismos de resistencia o tolerancia al patógeno (Byer *et al.*, 2024). Adicionalmente, se ha demostrado que otros animales y diversos fómites pueden actuar como vectores de transmisión, facilitando la dispersión del hongo sin verse necesariamente afectados por su presencia (McMahon *et al.*, 2013; Brannelly *et al.*, 2017; Byer *et al.*, 2024).

Hasta el momento, existe información limitada sobre los mecanismos mediante los cuales *Bd* es capaz de detectar la presencia de un hospedero en los cuerpos de agua (Thekkiniath *et al.*, 2015). No obstante, se ha propuesto que los anfibios secretan de manera constante diversos metabolitos secundarios y hormonas que, si bien resultan imperceptibles para otros individuos de la misma especie, pueden ser detectados por el hongo patógeno (Thekkiniath *et al.*, 2013). Estas moléculas actuarían como señales químicas capaces de activar distintas fases del ciclo de vida del hongo, así como de facilitar los procesos de colonización del hospedero y, potencialmente, de inducir la expresión de factores de virulencia (Thekkiniath *et al.*, 2013; Thekkiniath *et al.*, 2015; Fonner *et al.*, 2017).

Asimismo, *Bd* presenta una notable plasticidad ecológica que le permite infectar no sólo en ambientes acuáticos —donde afecta principalmente a ranas y sapos—, sino también persistir en ambientes terrestres (Lam *et al.*, 2011). El hongo puede dispersarse y localizar hospederos terrestres mediante estructuras resistentes de su ciclo de vida, particularmente las zoosporas, las cuales son funcionalmente análogas a las esporas de otros hongos y le confieren una elevada capacidad de supervivencia y transmisión en condiciones ambientales variables (Moss *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2011).

Una vez que *Bd* ha localizado a su hospedero, por ejemplo, en un cuerpo de agua, el hongo inicia el proceso de infección mediante la adhesión progresiva a la superficie de la piel en forma de zoospora ameboide (Kilpatrick *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2021; Brannelly *et al.*, 2017). Posteriormente, la zoospora entra en una fase de maduración durante la cual crece, se fija al epitelio cutáneo y desarrolla estructuras rizoidales que facilitan la colonización del tejido (Pereira *et al.*, 2021). Este proceso culmina con la formación de un esporangio, capaz de generar un tubo germinal que permite la invasión de las células epiteliales, dando lugar a una fase intracelular del patógeno, Ver Figura 4 (Kilpatrick *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2021; Brannelly *et al.*, 2017).

Una vez establecido en el interior de las células del epitelio, el hongo forma un zoosporangio que migra nuevamente hacia la superficie de la piel, donde libera miles de zoosporas móviles (Pereira *et al.*, 2021). Estas zoosporas representan la fase infectiva primaria del ciclo de vida de *Bd*, porque poseen la capacidad de dispersarse en el ambiente y de iniciar nuevas infecciones en otros anfibios, tanto en entornos acuáticos como terrestres (Kilpatrick *et al.*, 2010).

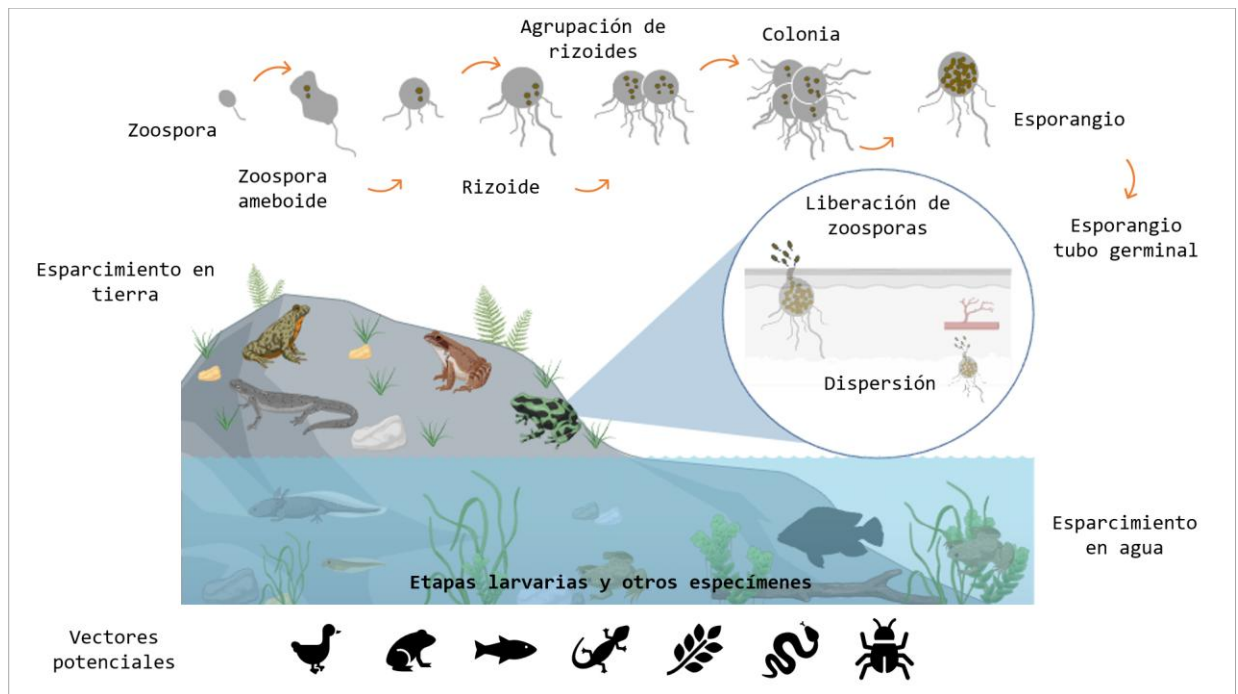


Figura 4. El ciclo de vida del hongo *Bd* y sus reservorios. Se muestra el ciclo de vida del patógeno iniciando como zoospora, madurando hasta convertirse en un esporangio, que, a su vez, puede liberar más zoosporas que tendrán la capacidad de infectar a otros anfibios. También en esta etapa, pueden diseminarse en la piel e incluso pueden llegar a los órganos. Se cree que la etapa de zoospora y la amebóide, puede estar presente en cuerpos de agua, sedimentos o suelo y, por lo tanto, ser la causa de transmisión de la enfermedad. Finalmente se muestran también los potenciales vectores que se cree que podrían estar ayudando a la dispersión del hongo. *Nota.* Fuente: Elaboración propia mediante Biorender y Powerpoint.

MECANISMOS DE PATOGÉNESIS

Aspectos inmunológicos anfibios-*B. dendrobatidis*

El sistema inmune de los anfibios incluye defensas innatas y adaptativas que son cruciales para combatir infecciones, especialmente en la piel, órgano principalmente afectado por el

hongo *B. dendrobatidis*. Las defensas innatas comprenden péptidos antimicrobianos en la piel, inmunoglobulinas específicas y el sistema del complemento, que puede inhibir el crecimiento de *Bd* mediante mecanismos como inflamación y lisis del patógeno (Ramsey *et al.*, 2010; Rodríguez & Voyles, 2020; Pacheco *et al.*, 2024). Sin embargo, *Bd* puede evadir o suprimir la respuesta inmune adaptativa, limitando la activación de anticuerpos y células inmunes efectivas, lo que favorece su persistencia en el hospedador (Rollins-Smith, 2020; Rollins-Smith & Le Sage, 2021). La temperatura ambiental influye fuertemente en la respuesta inmune: a temperaturas óptimas se observa una mayor expresión de defensas innatas como péptidos antimicrobianos, mientras que a temperaturas bajas la respuesta se vuelve más inflamatoria pero menos efectiva para controlar la infección (Ribas *et al.*, 2009). Además, *Bd* puede reducir la capacidad de las salamandras para montar respuestas inmunes mediadas por células, evidenciando un compromiso funcional del sistema inmune durante la infección (Venesky & Laskey, 2022). En algunas especies vulnerables como *Atelopus zeteki*, las secreciones cutáneas pueden incluso favorecer el crecimiento del hongo, mostrando que las defensas inmunes no siempre son protectoras y varían entre especies (Gass & Voyles, 2022).

En conjunto, estas investigaciones muestran que, aunque los anfibios poseen múltiples mecanismos inmunitarios para defenderse de *Bd*, el hongo ha desarrollado estrategias para evadirlos o debilitarlos, y factores ambientales como la temperatura modulan significativamente esta interacción (Ribas *et al.*, 2009; Ramsey *et al.*, 2010; Rodríguez & Voyles, 2020; Rollins-Smith, 2020; Rollins-Smith & Le Sage, 2021; Venesky & Laskey, 2022; Gass & Voyles, 2022; Pacheco *et al.*, 2024).

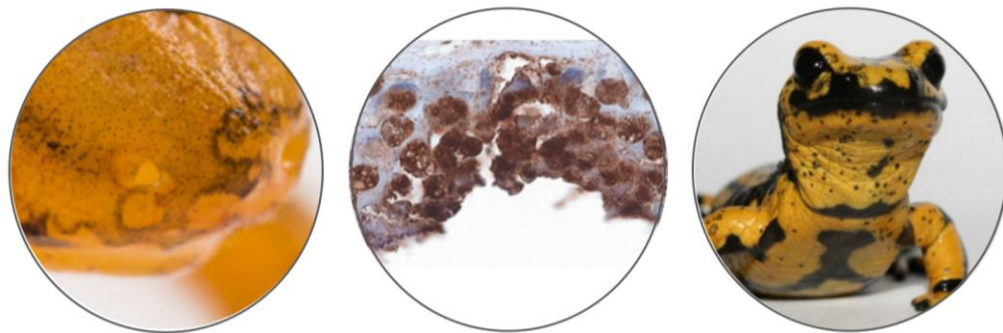
Signos y síntomas observados en animales infectados

La infección por *Bd* se manifiesta en los anfibios a través de un conjunto de signos clínicos que abarcan alteraciones conductuales, lesiones cutáneas y disfunciones fisiológicas (Peterson *et al.*, 2013). Entre los cambios de comportamiento más frecuentemente reportados se encuentran el letargo, la disminución de la actividad general y la pérdida de la coordinación motora (Parra Olea, 2021). En el caso de los anuros, estas alteraciones pueden traducirse en

una locomoción anómala, caracterizada por saltos torpes o una movilidad limitada de las extremidades. Asimismo, se ha documentado una reducción del apetito y, en etapas avanzadas de la infección, un estado general de debilidad (Peterson *et al.*, 2013).

Además de estos signos inespecíficos, existen manifestaciones cutáneas características de la enfermedad (Parra Olea, 2021). Entre ellas se incluyen la formación de llagas y lesiones superficiales, cambios en la coloración de la piel, la aparición de poros con pigmentación oscura, un incremento anormal en la producción de mucosidad cutánea y una aceleración del recambio epidérmico, fenómeno que puede observarse como una descamación excesiva de la piel, ver Figura 5 (Peterson *et al.*, 2013; Parra Olea, 2021).

La colonización del patógeno y la consecuente alteración de la integridad del tegumento generan una disrupción progresiva de las funciones fisiológicas esenciales de la piel (Sewell *et al.*, 2021). En particular, se ven comprometidos procesos críticos como la osmorregulación y el intercambio gaseoso, funciones que en los anfibios dependen en gran medida del epitelio cutáneo (Brannelly *et al.*, 2017). La pérdida de este equilibrio fisiológico puede derivar en alteraciones electrolíticas severas, paros cardíacos, insuficiencia respiratoria o asfixia, culminando finalmente en la muerte del individuo infectado (Brannelly *et al.*, 2017; Sewell *et al.*, 2021).



Martel *et al.*, 2013, Olson *et al.*, 2021 y Pascale van Rooij *et al.*, 2015

Figura 5. Signos de la infección. Se muestran los signos observados en salamandras por *Bd* y *Bsal*. También muestra los signos macroscópicos y microscópicos que causa la infección

vistos en salamandras. Daño en la piel a nivel microscópico, efecto de *Bd* y *Bsal* en la piel, genera manchas blancas y pérdida de pigmentación. **Nota.** Fuente: Elaboración propia. Imágenes de: A. Martel & F. Pasmans (Ghent University), UTIA Bsal Project, Martel *et al.*, 2013, Olson *et al.*, 2021 y Pascale van Rooij *et al.*, 2015, todas vía búsqueda Google.

LA MICROBIOTA COMO FACTOR MODULADOR

La microbiota y sus efectos en humanos y animales

El concepto de microbiota, definido como el conjunto de microorganismos que colonizan un organismo o un ambiente específico, comenzó a consolidarse a principios del siglo XX (Khosravi & Mazmanian, 2013). Durante este periodo, la investigación microbiológica se centró predominantemente en el estudio de bacterias patógenas y su vínculo directo con enfermedades infecciosas (Lu *et al.*, 2020). Sin embargo, de manera paralela, surgió un interés creciente por comprender el papel ecológico y funcional de los microorganismos asociados a distintos nichos del hospedero (Hou *et al.*, 2022). Esta perspectiva permitió reconocer que dichas comunidades microbianas no solo coexisten con el hospedero, sino que participan activamente en procesos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos fundamentales para su desarrollo y supervivencia (Khosravi & Mazmanian, 2013; Lu *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2022).

Uno de los más influyentes enfoques en el estudio de comunidades microbianas fue el análisis de la microbiota intestinal en humanos, el cual permitió establecer que los microorganismos no deben considerarse únicamente como agentes patógenos, sino también como componentes funcionales capaces de establecer interacciones mutualistas con el hospedero (Derovs *et al.*, 2019). A partir de estos estudios surgió el concepto de que la salud del organismo depende, en gran medida, del mantenimiento de un equilibrio dinámico entre comunidades microbianas con funciones benéficas y aquellas que, bajo ciertas condiciones, pueden perturbar dicho estado (Bosch *et al.*, 2024). La pérdida de este equilibrio —actualmente denominada disbiosis— ha sido identificada como un factor clave asociado a una amplia

gama de patologías y alteraciones fisiológicas, tanto en humanos como en otros organismos (Clemente *et al.*, 2012; Derovs *et al.*, 2019; Bosch *et al.*, 2024).

En la actualidad, se reconoce que los microorganismos que habitan el intestino, la piel, las mucosas y otras interfaces del organismo desempeñan funciones fundamentales en la homeostasis del hospedero (Chau *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado que determinadas comunidades microbianas participan activamente en la modulación del sistema inmune, entre otros mecanismos, a través de la producción de péptidos antimicrobianos (Xu *et al.*, 2020). La liberación de estos compuestos regula la colonización de otros microorganismos y contribuye al establecimiento y mantenimiento de una estructura microbiana estable (Chau *et al.*, 2011). Este estado de equilibrio es crucial para preservar la salud del hospedero y, cuando se ve alterado, puede conducir a procesos patológicos asociados a disbiosis (Derovs *et al.*, 2019).

Diversos grupos de investigación han documentado el papel central de la microbiota en estados de disbiosis y su asociación con una amplia variedad de enfermedades (Derovs *et al.*, 2019). Patologías como la depresión (Brown *et al.*, 2023), la obesidad y otros trastornos metabólicos (Riquelme *et al.*, 2019; Nejman *et al.*, 2020) han demostrado estar determinadas por factores que trascienden la genética del hospedero. En este contexto, se ha observado que variaciones en la diversidad, la abundancia y la composición taxonómica de la microbiota intestinal se correlacionan con una mayor susceptibilidad o resistencia a dichos padecimientos (Derovs *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2023).

Asimismo, estos perfiles microbianos no son estáticos ni universales, sino que se configuran dinámicamente en función de factores como la dieta, el ambiente y el historial de exposición a microorganismos (Ivanov & Honda, 2012). Esta plasticidad ecológica explica por qué no existen dos individuos con una microbiota idéntica y resalta la importancia de considerar al microbioma como un sistema dinámico y altamente dependiente del contexto (Ivanov & Honda, 2012; Clemente *et al.*, 2012).

En la actualidad, se reconoce que la microbiota no solo participa en la absorción de nutrientes, sino que también desempeña un papel determinante en la modulación de la distribución,

biodisponibilidad y eficacia de los fármacos dentro del organismo (Vanhoefer *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 2012; Kuznetzova *et al.*, 2017). Esta línea de investigación ha sido desarrollada principalmente en el ámbito oncológico, donde se ha documentado que numerosos agentes quimioterapéuticos pueden ser metabolizados por la microbiota del paciente antes de ejercer su acción terapéutica (Clemente *et al.*, 2012). Dichas transformaciones microbianas pueden dar lugar a metabolitos secundarios con potencial toxicidad o, alternativamente, reducir la fracción biodisponible del fármaco, impidiendo que se alcance una dosis clínicamente efectiva (Kuznetzova *et al.*, 2017).

Se ha documentado, por ejemplo, que bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Eubacterium* pueden inducir efectos adversos que restringen de manera significativa el rango terapéutico de distintos fármacos (Ting *et al.*, 2022). Un ejemplo paradigmático como el irinotecán (CPT-11), un agente quimioterapéutico de relevancia clínica en el tratamiento del cáncer colorrectal (CRC) y de su forma metastásica (Weersma *et al.*, 2020). Aunque el incremento de la dosis podría traducirse en una mayor eficacia antitumoral, esta estrategia resulta inviable en la práctica clínica, porque la interacción entre el fármaco y la microbiota intestinal del paciente puede desencadenar diarrea severa (Kuznetzova *et al.*, 2017). Este efecto adverso compromete rápidamente el estado fisiológico del paciente y limita la posibilidad de alcanzar un tratamiento efectivo (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017; Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022).

En respuesta a estas limitaciones, una de las estrategias emergentes en biomedicina consiste en el diseño racional de fármacos que incorporen de manera explícita el conocimiento sobre las interacciones entre los tratamientos y la microbiota del hospedero (Kuznetzova *et al.*, 2017). La identificación de los mecanismos microbianos responsables de la generación de efectos secundarios permite ajustar la formulación, la dosificación o el modo de administración de los compuestos con el objetivo de minimizar dichas interferencias (Torres-Carrillo *et al.*, 2023). Este enfoque abre la posibilidad de incrementar la dosis terapéutica sin comprometer la seguridad del paciente, mejorando de forma sustancial la eficacia clínica (Ting *et al.*, 2022). La viabilidad de este planteamiento ha sido demostrada en diversos casos, en los cuales la integración del componente microbiológico permitió optimizar la

intervención terapéutica (Vanhoefer *et al.*, 2001; Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022; Torres-Carrillo *et al.*, 2023).

El análisis de las interacciones entre la microbiota y la eficacia de los tratamientos farmacológicos ha dado lugar a un campo emergente conocido como farmamicrobiómica (Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022; Torres-Carrillo *et al.*, 2023). Este enfoque se centra en el estudio de cómo la microbiota, en particular la intestinal, puede modular tanto la efectividad terapéutica de los fármacos como la aparición y severidad de efectos secundarios asociados a su administración (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017; Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, la mayor parte de la evidencia disponible proviene de estudios en contextos clínicos humanos (Ting *et al.*, 2022). En consecuencia, existe una notable ausencia de investigaciones que evalúen de manera sistemática el papel de la microbiota en la modulación de la eficacia de tratamientos dirigidos a enfermedades infecciosas en fauna silvestre (Vanhoefer *et al.*, 2001). Asimismo, permanece inexplorada la posibilidad de que el incremento observado en la resistencia de patógenos a determinados compuestos terapéuticos esté vinculado a interacciones con la microbiota residente del hospedero, ya sea benéfica o alterada, tanto a nivel oral como intestinal (Weersma *et al.*, 2020). De igual forma, no se han desarrollado estrategias terapéuticas que integren explícitamente una visión ecológica del microbioma, en la cual se considere no sólo la eliminación del patógeno, sino también la restauración de la estructura comunitaria y de sus interacciones funcionales, incorporando de manera conjunta las dinámicas entre probióticos, patógenos y redes microbianas (Vanhoefer *et al.*, 2001; Kuznetzova *et al.*, 2017; Weersma *et al.*, 2020; Ting *et al.*, 2022).

La microbiota residente no solo puede modular la eficacia de los tratamientos químicos, sino que también influye de manera directa en el éxito de las terapias probióticas (Di Gioia *et al.*, 2020; Gowen *et al.*, 2023; Ng *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2025). Diversos estudios han evidenciado que la introducción de microorganismos exógenos puede desencadenar efectos no deseados, como el incremento en la resistencia a antibióticos derivado de la formación de nuevos biofilms entre microorganismos residentes y microorganismos implantados (Jiang *et*

al., 2025). Asimismo, se ha observado que los beneficios terapéuticos asociados a cambios en la composición microbiana suelen ser transitorios, porque la microbiota benéfica introducida frecuentemente no logra establecer una colonización estable a largo plazo (Ng *et al.*, 2023). Esto obliga, en muchos casos, a la aplicación prolongada de tratamientos probióticos, cuya eficacia depende de manera crítica de la composición original de la microbiota del hospedero y de la resistencia ecológica que esta ejerce frente a nuevos colonizadores (Di Gioia *et al.*, 2020). En consecuencia, la implantación exitosa de comunidades microbianas terapéuticas representa uno de los principales obstáculos en este tipo de intervenciones (Di Gioia *et al.*, 2020; Gowen *et al.*, 2023; Ng *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2025).

Si bien la microbiota intestinal ha sido una de las más extensamente estudiadas, no constituye la única de relevancia biológica (Ng *et al.*, 2023). Otras comunidades microbianas, como la microbiota cutánea y la asociada a las mucosas, han adquirido un interés científico creciente debido a su papel potencial en la resistencia frente a patógenos y en la regulación de procesos fisiológicos clave del hospedero (Derovs *et al.*, 2019). En particular, la composición microbiana de la piel puede interferir de manera significativa en la colonización de microorganismos introducidos con fines terapéuticos, limitando su establecimiento y, por ende, su capacidad para favorecer la reversión de la infección en individuos afectados (Gowen *et al.*, 2023). Estas variaciones en la estructura de la comunidad microbiana tienen implicaciones profundas en la respuesta inmunológica del hospedero, especialmente en la producción de mecanismos de defensa y en la variabilidad de la susceptibilidad a la enfermedad (Derovs *et al.*, 2019). Como resultado, el desenlace clínico puede variar ampliamente, desde infecciones subletales hasta un deterioro rápido y la muerte del organismo (Gajewski *et al.*, 2023).

La microbiota en anfibios

La microbiota asociada a un huésped es de gran importancia para el individuo; debido a que se sabe que está relacionada a la resistencia a ciertas enfermedades creando moléculas de defensa, y también benefician la salud en general, porque tienen la capacidad de evitar el crecimiento de patógenos que podrían ser una amenaza (Harris *et al.*, 2009; Bahrndorff *et al.*, 2016). En el caso de los anfibios, se ha visto que parte de los microorganismos asociados a la piel ayudan a inhibir el crecimiento de patógenos como *Bd* o *Bsal* (Harris *et al.*, 2009), o en el caso de los murciélagos ayuda a evitar infecciones causadas por patógenos emergentes como el hongo *Pseudogymnoascus destructans* que causa el síndrome de nariz blanca (Hoyt *et al.*, 2019).

El papel de la microbiota residente en anfibios

El sistema inmune de los anfibios presenta diferencias sustanciales con respecto al sistema inmune humano, particularmente en lo que concierne a sus mecanismos de defensa innata (Varga *et al.*, 2019). La mayoría de las especies de anfibios es capaz de secretar, a través del moco presente en la piel, una amplia variedad de moléculas con actividad antimicrobiana que constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones (Ruiz & Robert, 2023). Este sistema funcional es comparable, en términos generales, a la inmunidad innata descrita en humanos, aunque con características fisiológicas y ecológicas propias de este grupo (Varga *et al.*, 2019; Ruiz & Robert, 2023; O, 2025).

Las bacterias asociadas a la piel desempeñan un papel clave en este sistema de defensa y pueden tener distintos orígenes funcionales (Araya *et al.*, 2019). Por un lado, existen bacterias protectoras o con potencial probiótico que colonizan la piel del hospedero y son capaces de producir péptidos antimicrobianos (AMPs) (Bourquin *et al.*, 2022). Estas moléculas, en conjunto con el moco cutáneo, contribuyen indirectamente a la defensa inmunológica del hospedero (Berg *et al.*, 2020). Por otro lado, los anfibios también poseen la capacidad de sintetizar y secretar de manera autónoma AMPs de origen endógeno, los cuales

complementan la acción de la microbiota y fortalecen la respuesta inmune innata (Araya *et al.*, 2019; Berg *et al.*, 2020; Bourquin *et al.*, 2022).

Entre los péptidos antimicrobianos identificados en diversas especies de anfibios se encuentran la magainina 2, brevinina-1, dermaseptina S1, las temporinas y las esculentinas (Boman *et al.*, 2003). Estos compuestos han demostrado actividad antimicótica frente a *Bd*, lo que subraya su relevancia en la resistencia natural de algunas especies a la quitridiomycosis (Bartels *et al.*, 2019). Además, estos péptidos presentan un notable potencial biotecnológico, porque se les han atribuido propiedades adicionales, incluyendo actividades anticancerígenas, antiparasitarias, espermicidas y antivirales (Boman *et al.*, 2003; Bartels *et al.*, 2019).

En relación con los mecanismos de defensa mediados por bacterias residentes en la piel, estudios recientes han logrado identificar y aislar a *Janthinobacterium lividum*, una bacteria presente en la microbiota cutánea de algunos anfibios que, de manera notable, muestran resistencia o tolerancia a la infección causada por *Bd* (Becker *et al.*, 2009) En estos casos, la enfermedad puede cursar de forma asintomática o con signos clínicos mínimos, lo que sugiere un papel protector de esta bacteria frente al patógeno (Rollins-Smith *et al.*, 2009).

El principal compuesto bioactivo producido por *J. lividum* es la violaceína, un metabolito secundario al que se le ha atribuido una marcada actividad antifúngica, incluida su capacidad para inhibir o eliminar el crecimiento de *Bd*. A partir de estos hallazgos, se llevaron a cabo ensayos experimentales en los que *J. lividum* fue inoculada como tratamiento probiótico en anfibios infectados, con el objetivo de evaluar su potencial terapéutico (Becker *et al.*, 2009; Agate *et al.*, 2016; Becker *et al.*, 2021; Gass *et al.*, 2022). Sin embargo, los resultados de estos estudios revelaron limitaciones importantes: no todas las especies de anfibios albergan naturalmente a esta bacteria en su microbiota cutánea y, en la mayoría de los casos, los microorganismos inoculados no lograron colonizar de manera estable ni persistir en la piel de los individuos tratados (Becker *et al.*, 2009).

Adicionalmente, *J. lividum* ha sido identificada como un patógeno oportunista de relevancia en otros contextos ecológicos, debido a que puede causar infecciones severas en peces de

importancia económica, como se ha documentado en sistemas acuícolas de países como Corea del Sur (Oh *et al.*, 2019). Este doble papel —como agente protector en ciertos anfibios y como patógeno en otros organismos— subraya la complejidad ecológica de las intervenciones basadas en probióticos y refuerza la necesidad de evaluar cuidadosamente los riesgos asociados a su liberación o aplicación en ambientes naturales (Gass *et al.*, 2022).

Variaciones en la microbiota de anfibios

Se han encontrado datos interesantes, que indican que la microbiota de animales silvestres tiene cambios importantes influenciados por factores como la genética del animal, condiciones ambientales, características bióticas y abióticas del hábitat, la presencia o no de patógenos en su entorno, factores climáticos, pH, temperatura y además recientemente, se ha comenzado a estudiar que estos cambios también pueden estar asociados al desarrollo del hospedero (Loudon *et al.*, 2014; Bletz *et al.*, 2017 a y b).

En el caso específico de los anfibios, se ha demostrado que la microbiota de la piel de estos animales, especialmente en el caso de las ranas, tiende a cambiar antes y después del proceso de metamorfosis (Kueneman *et al.*, 2014; Martínez Ugalde *et al.*, 2022). Estos cambios en el desarrollo involucran la reabsorción de cola, la remodelación de órganos como el corazón, intestino, el cerebro; el desarrollo de extremidades también va de la mano con cambios en la piel (Kueneman *et al.*, 2014).

Durante la metamorfosis en anfibios, se induce un estado de inmunosupresión como resultado del efecto en la señalización de la hormona tiroidea y corticosteroides, para que el sistema inmune del animal se organice y adapte de manera gradual a la etapa adulta (Brown *et al.*, 2007). Todos estos cambios están relacionados también al cambio en la alimentación del animal, el cambio de ambiente en donde se desenvuelven y hasta cambios en el comportamiento (Rollins *et al.*, 1998).

La alteración de las respuestas inmunes en anfibios no ha sido tan documentada como una consecuencia de interacciones complejas entre el hospedero y su microbiota cutánea (Loudon *et al.*, 2014). En particular, se ha observado que cambios en la composición microbiana

pueden comprometer las primeras líneas de defensa inmunológica frente a infecciones, entre ellas la producción indirecta de compuestos antimicrobianos (antimicrobial peptides, AMPs), los cuales son generados en gran medida por bacterias específicas residentes en la piel (Patočka *et al.*, 2019).

La inhibición de estos mecanismos defensivos suele estar mediada por otras moléculas producidas y secretadas durante la colonización de comunidades microbianas alternativas, las cuales pueden incluir tanto microorganismos patógenos como no patógenos (Ye *et al.*, 2024). Cuando las bacterias benéficas no logran regular adecuadamente la liberación de AMPs, la integridad del sistema inmune del hospedero se ve comprometida (Gajewski *et al.*, 2023). Como consecuencia, se debilita la capacidad de la microbiota para favorecer el crecimiento de microorganismos protectores y para limitar la colonización y proliferación de patógenos, aumentando la susceptibilidad del hospedero a la infección y el riesgo de desenlaces adversos (Woodhams *et al.*, 2020; Gajewski *et al.*, 2023; Thumsová *et al.*, 2024).

En consecuencia, la letalidad de las enfermedades causadas por los hongos *Bd* y *Bsal* no es homologa entre grupos taxonómicos ni dentro de la misma especie, sino que depende de múltiples factores externos al hospedero que interactúan de manera compleja (García-Rodríguez *et al.*, 2022). Entre estos factores externos, se destacan la composición inicial de la microbiota del hospedero (Jiang *et al.*, 2025), la especie de hongo quitridiomiceto involucrada en la infección (Basanta *et al.*, 2022), así como las condiciones geográficas y climatológicas del entorno en el que habita el hospedero (García-Rodríguez *et al.*, 2022). Esta heterogeneidad explica la amplia variabilidad observada en los desenlaces clínicos, incluso entre individuos de una misma especie expuestos a un mismo patógeno (Jiang *et al.*, 2025).

Hasta el momento, se ha establecido que la enfermedad presenta una letalidad altamente variable, atribuible a la interacción de múltiples factores bióticos y abióticos (Longo *et al.*, 2019). Entre estos se incluyen las condiciones climatológicas y los factores geográficos del entorno (García-Rodríguez *et al.*, 2022), así como aspectos más específicos relacionados con la identidad del agente etiológico, ya sea *Bd*, *Bsal* o incluso la presencia simultánea de ambos

patógenos (Basanta *et al.*, 2022). Esta heterogeneidad constituye un punto central en el estudio de la quitridiomycosis, diversos trabajos han planteado la posibilidad de que eventos de coinfección o la emergencia de nuevos linajes con mayor virulencia puedan desencadenar escenarios de letalidad global, potencialmente conduciendo a la desaparición de poblaciones completas de anfibios susceptibles (Longo *et al.*, 2019).

El comportamiento atípico y la elevada plasticidad del patógeno han llevado a la hipótesis de que algunas especies de anfibios podrían poseer mecanismos de resistencia o tolerancia frente a la infección (Varga *et al.*, 2019; Gass *et al.*, 2022). Estos mecanismos podrían estar asociados a procesos de coevolución hospedero–patógeno a lo largo de escalas temporales extensas (Basanta *et al.*, 2022), o bien a la capacidad del hongo para establecer interacciones complejas con la microbiota cutánea residente de los anfibios, las cuales podrían modular la invasión, la persistencia y la severidad de la infección (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022; Gajewski *et al.*, 2023).

INTERACCIONES HOSPEDERO-MICROBIOTA-PATÓGENO

Interacción microbiota residente-patógenos

La literatura científica respalda que la presencia de bacterias potencialmente patógenas, incluso en bajas abundancias dentro de la microbiota residente, puede facilitar la colonización, incrementar la severidad y aumentar la letalidad de infecciones emergentes causadas por otros patógenos (Tewari & Dey, 2024). Este efecto ocurre aun cuando dichos microorganismos no sean capaces de inducir enfermedad por sí solos en individuos considerados sanos (Stevens *et al.*, 2021). Este fenómeno ha sido documentado en humanos, tanto en infecciones bacterianas como fúngicas y subraya la importancia de estudiar las interacciones microbiota–patógeno como un componente clave en la evolución, progresión y severidad de las enfermedades infecciosas (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2021; Tewari & Dey, 2024).

Estudios de los efectos de la microbiota en humanos, han demostrado que hay diversos mecanismos pueden dar lugar a este tipo de interacciones sinérgicas (Tewari & Dey, 2024). En primer lugar, se ha documentado la transición de bacterias comensales hacia estados patogénicos bajo condiciones favorables (Stevens *et al.*, 2021). Los cambios ambientales, la presencia de infecciones emergentes, la inmunosupresión del hospedero o la disrupción de la microbiota residente pueden facilitar que microorganismos tradicionalmente considerados comensales incrementen su capacidad de colonización y contribuyan indirectamente a una mayor letalidad de infecciones causadas por patógenos primarios (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2021; Tewari & Dey, 2024).

En segundo lugar, las interacciones funcionales entre la microbiota residente y los patógenos no requieren necesariamente que las bacterias presentes sean estrictamente comensales o patógenas (Santus *et al.*, 2021). En muchos casos, basta con que produzcan metabolitos secundarios o modifiquen el microambiente de manera que favorezcan la invasión, persistencia o virulencia de otros microorganismos (Will *et al.*, 2025). Un ejemplo bien documentado es *Candida albicans*, la cual puede aprovechar recursos generados por la microbiota residente humana para facilitar su invasión y aumentar la severidad de la infección (Santus *et al.*, 2021; Stevens *et al.*, 2021). Fenómenos similares han sido descritos para bacterias como *Staphylococcus aureus* (Will *et al.*, 2025; Stevens *et al.*, 2025).

Finalmente, los procesos de evolución adaptativa, en la microbiota de humanos y animales, representan un tercer mecanismo relevante (Young *et al.*, 2017). Bajo condiciones específicas, bacterias comensales pueden adquirir mutaciones o elementos genéticos móviles, como plásmidos, que incrementan su virulencia y contribuyen de manera indirecta a la gravedad de una infección, aun cuando no sean el agente etiológico principal (Young *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2025).

En el caso particular de *Bd*, aún se requieren estudios sistemáticos que analicen la relación entre la microbiota y el patógeno para determinar si existen interacciones microbianas que influyan en su capacidad de invasión, en la severidad de la infección o en la letalidad observada en poblaciones de anfibios (Young *et al.*, 2017). Este vacío de conocimiento

refuerza la necesidad de abordar la enfermedad desde una perspectiva integradora que considere explícitamente las interacciones microbiota-patógeno como parte del proceso infeccioso.

Interacciones microbiota-patógeno en anfibios

La microbiota cutánea de los anfibios desempeña un papel fundamental en la modulación de las infecciones por *Bd*, determinando tanto la intensidad de la infección como los desenlaces poblacionales (Bates *et al.*, 2022). Diversos estudios han demostrado que la estructura y composición del microbioma pueden predecir si las poblaciones experimentarán brotes epizoóticos letales o mantendrán infecciones enzoóticas (Bates *et al.*, 2018; Bates *et al.*, 2022) En el sapo partero pirenaico (*Alytes obstetricans*), la función del microbioma – incluyendo genes relacionados con competencia por recursos y señalización – explica las diferencias entre poblaciones que sufren mortalidad masiva y aquellas que coexisten con el patógeno (Bates *et al.*, 2018; Bates *et al.*, 2022). Asimismo, la riqueza y abundancia de bacterias con propiedades inhibitorias contra *Bd* se correlaciona inversamente con la carga del patógeno, como se ha observado en salamandras (*Ambystoma rivulare*) y ranas (*Lithobates spectabilis*), donde una mayor diversidad de bacterias protectoras se asocia con menores intensidades de infección (Nava-González *et al.*, 2021).

Las interacciones específicas entre la microbiota y diferentes genotipos de *Bd* sugieren mecanismos complejos que van más allá de un simple efecto protector general. En *Hyliola regilla*, la composición bacteriana se correlaciona tanto con la carga del patógeno como con su variación genética, indicando interacciones cepa-específicas que influyen en el curso de la infección (Basanta *et al.*, 2022). La infección por *Bd* también modifica activamente las redes microbianas, alterando la estructura de co-ocurrencia de bacterias y hongos, y reduciendo la abundancia de taxones potencialmente protectores (Sun *et al.*, 2023). Estos cambios microbianos pueden crear ciclos de retroalimentación que favorecen la progresión hacia cargas altas y desenlaces severos, como se evidencia en estudios donde la perturbación de la microbiota – ya sea por infección o por factores ambientales como sequías – resulta en mayor susceptibilidad al patógeno y eventos de mortalidad masiva (Sun *et al.*, 2023).

PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Esfuerzos actuales para combatir la infección por *B. dendrobatidis*

Las enfermedades emergentes representan un desafío particular para la sanidad animal, principalmente debido a su aparición abrupta en poblaciones de hospederos altamente susceptibles (Nichols *et al.*, 2001). En muchos casos, el sistema inmune del hospedero carece de mecanismos efectivos para reconocer y neutralizar al patógeno, lo que facilita la rápida progresión de la infección. En este contexto, los esfuerzos dirigidos a controlar o erradicar la infección por *Bd* han sido hasta ahora limitados, debido a que numerosos compuestos químicos y estrategias terapéuticas —incluyendo tratamientos físicos como la aplicación de calor— no han mostrado eficacia sostenida a largo plazo (Knapp *et al.*, 2022).

Entre los tratamientos más ampliamente evaluados se encuentran los antifúngicos azólicos, como el itraconazol, cuyo mecanismo de acción se basa en la alteración de la membrana plasmática y de la pared celular del hongo (Nichols *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2022). Dado su uso extendido y su eficacia demostrada en el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos, se esperaba que este compuesto ofreciera resultados favorables en el control de *Bd*. Sin embargo, estudios experimentales han evidenciado que su aplicación presenta limitaciones importantes, porque no resulta efectiva en todos los casos de infección y puede generar efectos adversos en los hospederos tratados, lo que restringe su uso generalizado como estrategia terapéutica viable (Nichols *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2022).

El uso de otras sustancias químicas, como el verde malaquita en combinación con formaldehído, también ha sido evaluado como una posible estrategia para el control de la infección por *Bd* (Hardy *et al.*, 2015). No obstante, estos compuestos han sido posteriormente descartados como opciones terapéuticas viables debido a la evidencia acumulada sobre sus efectos adversos a largo plazo, incluyendo propiedades potencialmente cancerígenas y mutagénicas observadas en distintos modelos experimentales (Knapp *et al.*, 2022; Hardy *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2019).

Además de los tratamientos antifúngicos, se han explorado alternativas basadas en el uso de antibióticos de amplio espectro, como el cloranfenicol (Knapp *et al.*, 2022). Sin embargo, este tipo de compuestos ha demostrado generar efectos secundarios significativos en anfibios, particularmente en ranas, donde se han observado alteraciones estructurales en leucocitos y otros componentes del sistema inmune (Roberts *et al.*, 2019). Resulta relevante que efectos similares han sido reportados en humanos, especialmente en pacientes con leucemia tratados con este antibiótico, lo que subraya los riesgos asociados a su uso y limita su aplicabilidad como tratamiento para la quitridiomycosis (Knapp *et al.*, 2022; Hardy *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2019).

A pesar de que esta infección ha estado presente en el ambiente durante décadas y de que su impacto sobre las poblaciones de anfibios ha sido ampliamente documentado, hasta la fecha no se ha desarrollado un tratamiento específico que sea completamente efectivo (Berger *et al.*, 2010). En particular, no existe una estrategia terapéutica que pueda aplicarse de manera consistente en distintas etapas de la infección y lo largo de los diferentes estadios de desarrollo del hospedero, que sea viable tanto en condiciones de vida libre como en cautiverio, y que además no genere efectos secundarios adversos en los animales ni impactos negativos sobre el medio ambiente (Berger *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2025).

En este contexto, el estudio de la microbiota asociada a animales afectados por enfermedades emergentes —y, de manera más específica, el análisis de las interacciones entre la microbiota residente y el patógeno— representa una vía prometedora para abordar interrogantes fundamentales que permanecen sin respuesta (Wan *et al.*, 2025). Entre ellas destacan preguntas clave como: ¿Por qué la infección es asintomática en algunas especies de anfibios, mientras que en otras resulta altamente letal?, o ¿por qué ciertos tratamientos químicos muestran una eficacia limitada o nula? (Campbell *et al.*, 2019). Estas interacciones microbianas pueden inducir transiciones entre estados de estabilidad asociados a la salud y estados de disbiosis, modulando de manera crítica la progresión de la enfermedad.

En consecuencia, una de las principales áreas de oportunidad de este trabajo radica en el diseño racional de moléculas y estrategias terapéuticas dirigidas específicamente contra

patógenos emergentes como *Bd*, con el objetivo no solo de inhibir o eliminar al patógeno, sino también de restaurar el equilibrio funcional de la microbiota residente (Campbell *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2025). Adicionalmente, resulta fundamental explorar enfoques que permitan evaluar y optimizar estas estrategias de manera predictiva, incluso antes de su síntesis o aplicación experimental, mediante modelos teóricos, computacionales o ecológicos que integren explícitamente la dinámica hospedero–microbiota–patógeno (Campbell *et al.*, 2019).

La microbiota residente en la piel de la mayoría de los anfibios está fuertemente modulada por factores externos, los cuales pueden clasificarse de manera general en bióticos y abióticos (Gajewski *et al.*, 2023). En este contexto, los cambios ambientales acumulativos en el hábitat—en su mayoría derivados de actividades antropogénicas— desempeñan un papel determinante en la susceptibilidad del hospedero a las infecciones (Neely *et al.*, 2023). Dichos cambios pueden influir indirectamente en la composición y estabilidad de la microbiota cutánea a través de la activación sostenida de respuestas fisiológicas al estrés, como la liberación crónica de hormonas glucocorticoides, particularmente el cortisol, las cuales tienen efectos conocidos sobre la inmunocompetencia y la regulación microbiana (Rollins-Smith & Le Sage, 2023; Neely *et al.*, 2023).

Se ha demostrado que el mantenimiento de una microbiota equilibrada es un factor clave para la atenuación de los síntomas asociados a diversas enfermedades, incluyendo la infección causada por *Bd* (Bletz *et al.*, 2017). En este marco, las terapias basadas en la microbiota han emergido como una estrategia prometedora tanto en medicina humana como veterinaria (Harris *et al.*, 2009; Jani *et al.*, 2018). En particular, la inoculación o el trasplante de bacterias con potencial probiótico, provenientes de individuos relativamente sanos, hacia individuos afectados ha mostrado efectos positivos en algunas especies de anfibios, al contribuir a la restauración del equilibrio microbiano y a la reducción de la carga patogénica (Harris *et al.*, 2009; Jani *et al.*, 2018).

Las evaluaciones experimentales de tratamientos basados en la microbiota para el control de *Bd* se han aplicado en una amplia variedad de especies de anfibios (Muletz *et al.*, 2012). Sin

embargo, estos enfoques han mostrado limitaciones importantes en términos de escalabilidad y generalización, lo que ha impedido su implementación exitosa en muchas otras especies susceptibles (Muletz *et al.*, 2012; Becker *et al.*, 2015; Kueneman *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2019; Gajewski *et al.*, 2023). Además, estos estudios han puesto de manifiesto un riesgo adicional: algunos de los microorganismos empleados como agentes protectores frente al patógeno pueden comportarse como patógenos oportunistas para otras especies que coexisten en el mismo hábitat, lo que plantea serias preocupaciones ecológicas y éticas sobre su uso indiscriminado (Li *et al.*, 2022).

En este contexto, resulta fundamental profundizar en el análisis de la estructura y organización de las comunidades microbianas presentes en la piel de los anfibios. Un enfoque que integre la caracterización detallada del bacterioma, el estudio de sus interacciones mediante herramientas de análisis de redes y la evaluación de su estabilidad y vulnerabilidad en estados de salud y enfermedad puede proporcionar información crítica para el diseño de estrategias terapéuticas más seguras, efectivas y específicas (Woodhams *et al.*, 2015; Piovio-Scott *et al.*, 2017).

Alcance y estructura de la investigación

En este contexto, el presente proyecto propone abordar la infección causada por *Bd* mediante la integración de dos enfoques bioinformáticos complementarios. Por un lado, el uso de herramientas computacionales, particularmente en el entorno R, permitirá realizar análisis exhaustivos de secuencias biológicas, así como inferir y analizar redes microbianas y biológicas asociadas a la enfermedad. Por otro lado, la implementación de herramientas de diseño de proteínas posibilitará explorar estrategias racionales para el desarrollo de moléculas con potencial terapéutico. La combinación de ambos enfoques busca ofrecer una perspectiva integral del problema, que no solo considere la estructura y dinámica de la microbiota asociada al hospedero, sino que también propone rutas innovadoras para el tratamiento de la infección por *Bd*. La aplicación de herramientas bioinformáticas que no

estaban disponibles o consolidadas en estudios previos permite abordar de manera integral distintos aspectos de un mismo sistema de estudio.

Por lo tanto, el presente proyecto está constituido por resultados obtenidos e información que fue publicada por el grupo de laboratorio recientemente, datos que, para esta tesis fueron estructurados en tres capítulos:

Capítulo I. Estudio de la composición y estructura de la microbiota cutánea en salamandras: El análisis de las diferencias en la composición, estructura y vulnerabilidad de las comunidades bacterianas presentes en la piel de salamandras, utilizando datos de secuenciación del gen 16S rRNA provenientes de individuos con y sin infección por *Bd*. Estas muestras, además, corresponden a especies con distintos grados de susceptibilidad tanto a *Bd* como a *Bsal*. Posteriormente, mediante herramientas de detección de patógenos que emplean archivos en formato FASTA como entrada, será posible

Capítulo II. La identificación de patógenos y la búsqueda de dianas terapéuticas: La identificación de un conjunto específico y bien definido de bacterias patógenas presentes en estas comunidades, con el objetivo de seleccionar dianas moleculares candidatas para su análisis funcional.

Capítulo III. El diseño de proteínas terapéuticas, su modelaje estructural y su evaluación: La construcción de un marco de diseño y modelamiento estructural de proteínas orientado al desarrollo racional de una proteína terapéutica dirigida contra la infección causada por *Bd*. Esta proteína estaría diseñada para actuar sobre múltiples blancos moleculares, incluyendo tanto al hongo patógeno como a bacterias potencialmente patógenas que podrían favorecer la colonización o persistencia de *Bd* en la piel del hospedero (Harrison *et al.*, 2019). La función esperada de dicha proteína sería inducir una reestructuración controlada de la microbiota en estados de disbiosis, promoviendo la restauración de comunidades microbianas residentes con efectos benéficos para el hospedero.

En conjunto, la expectativa de este estudio es que la estrategia propuesta no solo contribuya de manera directa a la reducción de la infección por *Bd*, sino que también incremente la

robustez y eficacia de tratamientos previamente evaluados, los cuales han mostrado resultados inconsistentes a lo largo del tiempo. De este modo, el enfoque integrador planteado busca sentar las bases para el desarrollo de intervenciones terapéuticas más estables, específicas y ecológicamente informadas.

HIPÓTESIS

Hay diferencias estructurales, composicionales y de vulnerabilidad en la microbiota de las salamandras no infectadas versus aquellas infectadas por *Bd*. Además, estas diferencias puntuales en patógenos se pueden utilizar como blancos moleculares en el desarrollo de tratamientos específicos multi-blanco.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición y los patrones diferenciales de la microbiota cutánea en salamandras, así como su papel potencial en la mitigación de *Bd*, orientado al desarrollo de estrategias de tratamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un enfoque integral para el análisis de comunidades microbianas, que permita caracterizar su composición, estructura de interacciones y estabilidad ecológica a partir de datos de secuenciación.
2. Comparar la composición taxonómica de la microbiota cutánea de salamandras sanas e infectadas por *Bd*, utilizando datos disponibles en bases de datos públicas, para identificar diferencias asociadas al estado de salud.
3. Analizar la organización estructural y las propiedades topológicas de las comunidades microbianas en individuos sanos e infectados, considerando distintas categorías de susceptibilidad del hospedero.

4. Evaluar la vulnerabilidad ecológica de las redes microbianas cutáneas en función del estado de salud y la susceptibilidad del hospedero, identificando configuraciones asociadas a estados de disbiosis.
5. Identificar microorganismos patógenos y funciones microbianas clave que puedan ser utilizados como dianas moleculares en el desarrollo de estrategias terapéuticas multi-blanco dirigidas a la mitigación de la infección por *Bd*.
6. Desarrollar un marco metodológico computacional para el diseño de proteínas, orientado a optimizar sus propiedades estructurales y funcionales con fines terapéuticos.

JUSTIFICACIÓN

La relevancia de este estudio reside en que la conservación de los anfibios tiene implicaciones ecológicas y sanitarias de gran escala. Los anfibios desempeñan un papel fundamental en el control biológico de insectos vectores de enfermedades de importancia para la salud pública, como el dengue, el zika y la malaria. Por tanto, el desarrollo de estrategias efectivas para mitigar la quitridiomycosis no solo contribuye a la conservación de la biodiversidad, sino que también favorece la estabilidad de los ecosistemas y la reducción del uso de agentes químicos con impacto ambiental negativo.

La ausencia de un tratamiento efectivo y universal contra la infección causada por *Bd* pone de manifiesto las limitaciones de los enfoques terapéuticos tradicionales, centrados principalmente en la eliminación directa del patógeno (Kueneman *et al.*, 2016). Evidencia reciente sugiere que una de las principales razones de esta falta de eficacia radica en la elevada variabilidad de la microbiota cutánea de los anfibios, la cual modula de manera crítica la susceptibilidad del hospedero, la progresión de la infección y la respuesta a los tratamientos (Jani *et al.*, 2018). En particular, se ha propuesto que *Bd* puede incrementar su patogenicidad y letalidad al interactuar con comunidades microbianas asociadas a estados de disbiosis, incluyendo microorganismos con potencial patogénico que favorecen su colonización y persistencia (Bletz *et al.*, 2017).

Bajo este marco, la hipótesis central de este trabajo plantea que la microbiota cutánea de salamandras no infectadas difiere significativamente, en composición, estructura y vulnerabilidad ecológica, respecto a la de individuos infectados por *Bd*, y que estas diferencias definen microorganismos y funciones microbianas que favorecen la infección (Kueneman *et al.*, 2016). De manera consecuente, dichos componentes microbianos representan dianas moleculares potenciales para el desarrollo de estrategias terapéuticas multi-blanco, dirigidas tanto al patógeno fúngico como a elementos clave de la microbiota que facilitan la disbiosis (Jani *et al.*, 2018).

El enfoque del presente trabajo adquiere especial relevancia al centrarse en salamandras, un grupo de anfibios que presenta diferencias fisiológicas importantes respecto a los anuros y que, además, muestra una mayor susceptibilidad a *Bd* y una coinfección *Bd-Bsal*, que podría estar asociada a incrementos significativos en la letalidad de la enfermedad (Thumsová *et al.*, 2024). Esta condición refuerza la necesidad de estudiar de manera específica la interacción entre el patógeno y la microbiota cutánea en este grupo, así como de desarrollar estrategias terapéuticas adaptadas a su biología particular (Jani *et al.*, 2018).

La relevancia de este estudio reside en que la conservación de los anfibios tiene implicaciones ecológicas y sanitarias de gran escala (Jani *et al.*, 2018). Los anfibios desempeñan un papel fundamental en el control biológico de insectos vectores de enfermedades de importancia para la salud pública, como el dengue, el zika y la malaria (Kueneman *et al.*, 2016). Por tanto, el desarrollo de estrategias efectivas para mitigar la quitridiomycosis no solo contribuye a la conservación de la biodiversidad, sino que también favorece la estabilidad de los ecosistemas y la reducción del uso de agentes químicos con impacto ambiental negativo (Bletz *et al.*, 2017).

CAPITULO I.- Estudio de la composición y estructura de la microbiota cutánea en salamandras

Esta parte -capítulo- de la tesis está enfocada al estudio de la composición, estructura y robustez diferenciales de la microbiota en tres especies de salamandras. Este capítulo forma parte del artículo disponible como preprint:

Ramírez-Villarreal, J., & Álvarez-Martínez, R. (2026). Network Topology Reveals *Bd*-Associated Restructuring of Salamander Skin Bacteria Communities Despite Conserved Composition.

Con el paso del tiempo y el avance de las investigaciones científicas, se han identificado nuevas causas de enfermedades, entre las que destaca la disbiosis microbiana, que actualmente se ha vinculado con múltiples patologías que van más allá de las infecciones. Enfermedades que antes se atribuían exclusivamente a factores fisiológicos específicos, como la depresión, el párkinson, las enfermedades inflamatorias intestinales y el autismo, por ejemplo, han mostrado tener conexiones con alteraciones en la microbiota. Por esta razón, resulta fundamental estudiar la microbiota de animales sanos y enfermos, y comparar sus perfiles microbianos para comprender mejor enfermedades como la causada por *Bd*. Este tipo de análisis permite identificar qué elementos de la microbiota son determinantes para que una misma infección resulte altamente letal en ciertas especies de anfibios, mientras que en otras no tenga la misma gravedad. Además, ayuda a responder a preguntas sobre la eficacia diferencial de los tratamientos químicos que funcionan en algunos individuos, pero no en otros. Contar con información detallada sobre estos aspectos puede contribuir significativamente a mejorar la calidad de vida de las especies susceptibles, fortalecer las estrategias de conservación y garantizar la continuidad de sus funciones ecológicas. Del mismo modo, esta información podría sentar las bases para la investigación y el desarrollo de tratamientos innovadores, más específicos y eficaces, dirigidos exclusivamente contra la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed utilizando las siguientes combinaciones de términos y sus variantes: "*skin amphibian microbiome*" y "*skin salamander microbiota*". A partir de los resultados obtenidos, se elaboró una tabla que incluyó todos los artículos recuperados junto con sus características principales: autores, año de publicación, metodología empleada, especie estudiada y región geográfica de muestreo.

Posteriormente, se llevó a cabo una revisión detallada de la metodología de cada estudio con el objetivo de identificar aquellos que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión para el metaanálisis:

- Utilización del mismo tipo de plataforma de secuenciación.
- Secuenciación de regiones idénticas del gen 16S rRNA.
- Disponibilidad de coordenadas geográficas del sitio de muestreo.
- Reporte de detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) mediante PCR o qPCR.

Dado que los manuscritos identificados presentaron una marcada heterogeneidad en cuanto a las especies de anfibios estudiadas, las regiones geográficas de muestreo, el tamaño muestral y, particularmente, las regiones del gen 16S rRNA secuenciadas, únicamente un estudio cumplió con la mayoría de los criterios establecidos.

El trabajo seleccionado corresponde al artículo titulado "*Inhibitory Bacterial Diversity and Mucosome Function Differentiate Susceptibility of Appalachian Salamanders to Chytrid Fungal Infection*", publicado por Muletz-Wolz y colaboradores en 2022. Las secuencias de amplicones del gen 16S rRNA fueron obtenidas del repositorio público bajo el número de BioProject PRJNA659464. Las muestras corresponden a salamandras colectadas en la región de Virginia, Estados Unidos, e incluyen información sobre la detección de *Bd* mediante PCR o qPCR para cada individuo. No obstante, los datos disponibles no permitieron determinar la

presencia o ausencia de signos clínicos de quitridiomycosis en los animales muestreados. La amplificación reportada en el estudio original abarcó la región V3-V5 del gen 16S rRNA.

Base de datos

La base de datos analizada en el presente estudio está conformada por secuencias del gen 16S rRNA provenientes de tres especies de salamandras: *Eurycea bislineata*, *Notophthalmus viridescens* y *Desmognathus monticola*. Para cada especie se identificaron archivos SRA (*Sequence Read Archive*) correspondientes a individuos con detección positiva y negativa de *Bd*.

Con el objetivo de preservar la independencia taxonómica del hospedero, se construyeron bases de datos separadas por especie. Las características asociadas a cada muestra fueron incorporadas como metadatos en el objeto *phyloseq* generado en el entorno R. En total, se obtuvieron 32 muestras: 15 correspondientes a individuos con detección positiva de *Bd* y 17 a individuos sin detección del patógeno.

La descarga de las secuencias se realizó mediante SRA Toolkit, utilizando los identificadores únicos de cada muestra disponibles en el BioProject PRJNA659464. Posteriormente, los archivos en formato .SRA fueron convertidos a formato FASTQ para facilitar su procesamiento bioinformático.

Origen de las muestras

Para este capítulo, se utilizaron muestras de las especies de salamandras *E. bislineata*, *N. viridescens* y *D. monticola*. Las coordenadas recuperadas de la base de datos en la página del Bioproject indican dos sitios de Virginia, Estados Unidos: Brightwood y Front Royal. Algunos de los sitios muestran cierto grado de fragmentación del hábitat; sin embargo, todavía se conservan zonas cercanas a estos puntos que mantienen un área ideal para el desarrollo y la sobrevivencia de las salamandras. Ambos sitios se encuentran cercanos a un par de ríos que atraviesan gran parte del área de Virginia (Ver Figura 6).

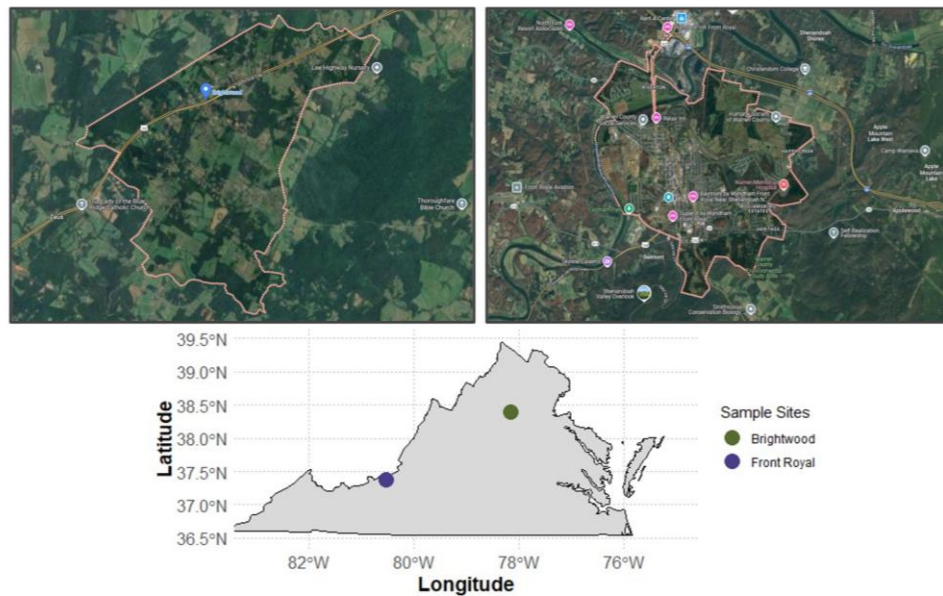
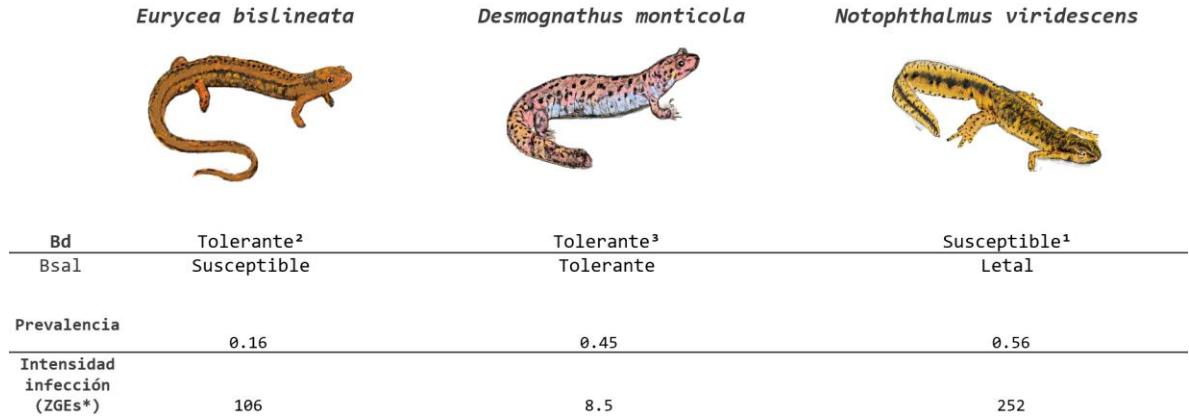


Figura 6. Mapa de procedencia de las muestras. Este mapa es una representación gráfica de Virginia Estados Unidos, las muestras en este proyecto descargadas y analizadas pertenecen a las coordenadas de latitud y longitud de 38.390922 N 78.148766 W que corresponden para los animales *D. monticola* y *E. bislineata*. Brightwood se muestra en color verde. Front Royal se localiza en el mapa en color azul, que es el sitio de muestreo de las salamandras de género *Notophthalmus* con coordenadas de latitud y longitud 37.37418 N, 80.52169 W. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Carga del patógeno *B. dendrobatidis* en las salamandras muestreadas y susceptibilidad

Dentro de los datos disponibles para cada una de las salamandras que fueron incluidas en nuestra base de datos para analizar, se tomó en cuenta el grado de susceptibilidad que tiene cada especie de salamandra, el cual era distinto para cada caso. Basados en esta información y en la intensidad de la infección ZGEs (Estimación de zoosporas presentes en una muestra, a partir de la cantidad de ADN detectado), se catalogaron dentro de este estudio para sus comparaciones por pares a *Eurycea* como Tolerante-Resistente a *Bd*, a *Desmognathus*

también se le etiquetó para el estudio como una especie Tolerante y a *Notophthalmus* como una especie altamente susceptible a la infección (Ver Figura 7).



*Estimación de zoosporas presentes en una muestra, a partir de la cantidad de ADN detectado

Pascale Van Rooij *et al.*, 2015, Jiménez *et al.*, 2022

Figura 7. Susceptibilidad observada en salamandras. En el presente diagrama se muestra la categoría correspondiente de susceptibilidad para cada especie de salamandra estudiada en el proyecto, además de que se muestra la prevalencia de la infección por especie de animal y la intensidad de infección que presentaron cada una de las salamandras aquí estudiadas (mostrado en el orden de los superíndices de mayor a menor 1-3) y que fueron reportados por Jiménez *et al.*, 2022 y la susceptibilidad registrada por Van Rooij *et al.*, 2015. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025a.

Procesamiento de secuencias

El análisis de las secuencias se realizó mediante el paquete DADA2 en R, siguiendo el flujo de trabajo estándar para datos de amplicones. Este procesamiento incluyó: (1) evaluación de la calidad de las lecturas, (2) filtrado y recorte de secuencias según perfiles de calidad, (3) modelado y corrección de errores de secuenciación, (4) eliminación de quimeras, y (5)

ensamblaje de las lecturas sentido (*forward*) y anti-sentido (*reverse*) para generar variantes de secuencia del amplicón (ASVs).

La información taxonómica y los metadatos asociados fueron integrados en un objeto *phyloseq* para facilitar los análisis posteriores. La asignación taxonómica se realizó mediante el clasificador implementado en DADA2, utilizando la base de datos de referencia SILVA versión 138.1.

Análisis de abundancias y diversidad

Abundancias relativas

Se calcularon las abundancias relativas de los taxones identificados, tanto para cada muestra individual como agrupadas según la condición de detección de *Bd* (positivo/negativo).

Diversidad alfa

Para evaluar la diversidad dentro de cada grupo, se calcularon los siguientes índices de diversidad alfa:

- Índice de Shannon: considera tanto la riqueza como la equitatividad de la comunidad.
- Índice de Simpson: pondera la dominancia de taxones abundantes.
- Índice de Chao1: estima la riqueza total de especies, incluyendo aquellas no observadas.

Las diferencias en los índices de diversidad alfa entre los grupos con y sin detección de *Bd* fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney, dada la naturaleza de los datos y el tamaño muestral.

Diversidad beta

La diversidad beta fue analizada mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, permitiendo visualizar el agrupamiento de las muestras según su composición microbiana.

Para evaluar si las diferencias observadas entre grupos eran estadísticamente significativas, se aplicó un análisis PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*) mediante la función `adonis2` del paquete *vegan*, con 9,999 permutaciones y los parámetros predeterminados.

Identificación de marcadores y microbiota diferencial

Para identificar taxones diferencialmente abundantes entre las condiciones de Bd detectado y no detectado, se emplearon dos aproximaciones complementarias.

Análisis LEfSe

Se realizó un Análisis de Tamaño del Efecto mediante Discriminante Lineal (LEfSe, *Linear Discriminant Analysis Effect Size*), el cual combina pruebas estadísticas con la estimación del tamaño del efecto biológico. Este análisis permite identificar taxones que caracterizan cada condición, tanto a nivel de familia como de género. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, implementada a través del paquete *MicrobiomeMarker* en R.

Análisis ANCOM-BC

De manera complementaria, se aplicó el método ANCOM-BC (*Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction*), el cual corrige el sesgo inherente a los datos composicionales de microbioma. Se calculó el estadístico de Wald para identificar familias y géneros con abundancias diferenciales significativas entre ambas condiciones.

Inferencia de redes de co-ocurrencia

La estructura de las comunidades microbianas fue explorada mediante la construcción de redes de co-ocurrencia, empleando dos metodologías complementarias.

Metodología 1: Correlación de Pearson con SpiecEasi

Se generaron redes de co-ocurrencia para cada condición de salud (*Bd* positivo y *Bd* negativo), sin distinción por especie de hospedero, utilizando los paquetes *Microbiome*, *SpiecEasi* e *igraph* de R. Para la construcción de las redes completas se aplicó correlación de Pearson con un umbral de $|r| \geq 0.8$, eliminando conexiones débiles. La detección de comunidades se realizó mediante el algoritmo de Louvain. La identificación taxonómica de los nodos se realizó a nivel de phylum. Para las redes *core*, que representan las asociaciones más robustas, se aplicó un umbral más restrictivo ($|r| \geq 0.9$), eliminando nodos sin conexiones. Estas redes fueron inferidas a nivel de género.

Metodología 2: Algoritmo ARACNE

Como aproximación alternativa, se empleó el algoritmo ARACNE (*Algorithm for the Reconstruction of Accurate Cellular Networks*), implementado en el paquete *minet* de R. Este algoritmo, basado en teoría de la información, elimina conexiones indirectas mediante el procesamiento de inequidad de datos (*Data Processing Inequality*), generando redes más parsimoniosas. Para las redes *core* se aplicó correlación de Spearman con un umbral de $|\rho| \geq 0.9$ a nivel de género. Estas funcionalidades fueron integradas mediante el paquete *mlBioNets* (<https://github.com/Nertekkad>).

Visualización y análisis topológico

Las redes generadas fueron exportadas a Gephi para su visualización. Se aplicó el algoritmo de distribución espacial Fruchterman-Reingold con los siguientes parámetros: velocidad = 1, gravedad = 10, área = 10,000. En las redes completas se aplicó un filtro de grado para retener únicamente nodos con más de 20 conexiones. La apariencia de los nodos fue modificada según los valores de correlación y grado nodal. Se generaron redes independientes para: (1) cada condición de salud (*Bd* positivo vs. negativo), y (2) cada especie de salamandra.

Análisis de centralidades y propiedades topológicas

Las métricas de centralidad fueron calculadas en Cytoscape, incluyendo:

- Centralidad de grado: número de conexiones directas de cada nodo.
- Centralidad de intermediación (*betweenness*): frecuencia con que un nodo actúa como puente en los caminos más cortos entre otros nodos.
- Centralidad de cercanía (*closeness*): inverso de la distancia promedio de un nodo a todos los demás.

Adicionalmente, se calculó la modularidad de cada red para evaluar su estructura comunitaria.

Análisis estadístico de propiedades de red

La normalidad de las distribuciones de centralidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Los análisis fueron realizados agrupando las muestras por condición de detección de *Bd* y por susceptibilidad reportada de la especie hospedadora. Las comparaciones composicionales entre condiciones y especies fueron visualizadas mediante diagramas de Venn, generados con los paquetes *ggplot2* y *ggvenn* de R.

Análisis de vulnerabilidad estructural

Con el objetivo de evaluar las diferencias estructurales entre las redes microbianas asociadas a cada condición de salud, se realizó un análisis de robustez mediante simulaciones de remoción secuencial de nodos. Este análisis permite determinar la resiliencia de cada red ante perturbaciones y estimar su vulnerabilidad frente a la pérdida de componentes clave de la comunidad microbiana.

Las redes inferidas a nivel de género fueron sometidas a cuatro estrategias de remoción de nodos:

1. **Remoción aleatoria:** los nodos fueron eliminados de manera estocástica, sin considerar sus propiedades topológicas. Esta estrategia simula la pérdida no dirigida de taxones y permite evaluar la tolerancia general de la red ante perturbaciones aleatorias.
2. **Remoción en cascada:** además de eliminar el nodo seleccionado, se cuantificó el efecto de la pérdida de sus conexiones directas y la subsecuente desconexión de nodos dependientes. Esta estrategia permite evaluar la propagación de perturbaciones a través de la red y simula escenarios donde la pérdida de un taxón desencadena la desaparición de organismos funcionalmente dependientes.
3. **Remoción por centralidad de intermediación (*betweenness*):** los nodos fueron eliminados en orden decreciente según su valor de *betweenness*, priorizando aquellos que actúan como conectores críticos entre diferentes regiones de la red. Esta estrategia representa un ataque dirigido hacia los nodos estructuralmente más importantes para la cohesión de la red.
4. **Remoción por grado (*degree*):** los nodos fueron eliminados en orden decreciente según su número de conexiones, comenzando por los *hubs* o nodos más conectados. Esta estrategia simula la pérdida de taxones con mayor número de interacciones dentro de la comunidad.

Para cada estrategia, se cuantificó la pérdida de conectividad de la red en función del porcentaje de nodos removidos, generando curvas de vulnerabilidad que permiten comparar la robustez estructural entre condiciones. Las diferencias en los patrones de vulnerabilidad entre las redes de individuos con y sin detección de *Bd* fueron evaluadas estadísticamente mediante ANOVA de una vía para cada estrategia de remoción. Cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba *post-hoc* de Tukey para identificar comparaciones específicas entre grupos.

RESULTADOS

Análisis de abundancias

Composición bacteriana general

Con el objetivo de caracterizar la composición bacteriana de las comunidades cutáneas asociadas a cada condición de detección de *Bd*, se realizaron análisis de abundancias absolutas y relativas a múltiples niveles taxonómicos (phylum, familia y género). Estos análisis se llevaron a cabo tanto de manera agrupada por condición de salud como de forma individual para cada muestra. Se emplearon distintos métodos de visualización, obteniéndose resultados consistentes entre aproximaciones (Figuras Suplementarias 1-6).

Abundancias a nivel de phylum y orden

Los perfiles de composición bacteriana fueron similares entre ambas condiciones de salud, sin observarse diferencias indicativas de cambios asociados a la detección de *Bd*. Cabe destacar que se detectó una variabilidad considerable en las proporciones de taxones entre individuos pertenecientes a un mismo grupo. A nivel de orden, los taxones con mayores abundancias relativas en ambas condiciones fueron Enterobacterales, Pseudomonadales, Rhizobiales, Micrococcales y Xanthomonadales (Figuras Suplementarias 1 y 2).

A nivel de phylum, la composición fue notablemente homogénea entre condiciones. El phylum Proteobacteria fue el dominante en todas las muestras, seguido de Actinobacteriota. Este último presentó abundancias particularmente elevadas en un número reducido de muestras, tanto en individuos con detección positiva como negativa de *Bd*. El phylum Bacteroidota fue detectado en proporciones menores en algunas muestras de ambos grupos, mientras que Firmicutes estuvo presente de manera consistente, pero en proporciones considerablemente inferiores respecto a Proteobacteria (Figuras Suplementarias 3-6).

Abundancias a nivel de familia y género

Dado que los análisis a niveles taxonómicos superiores no revelaron diferencias marcadas entre condiciones, se procedió a explorar la composición a niveles de mayor resolución taxonómica (familia y género), con el objetivo de detectar posibles diferencias más sutiles (Ver Figuras 8-10).

A nivel de familia, los perfiles de composición continuaron siendo similares entre ambos grupos. Las familias con mayor abundancia relativa en ambas condiciones fueron Vibrionaceae y Halomonadaceae. Otras familias abundantes incluyeron Pseudomonadaceae, Alteromonadaceae, Xanthomonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Rhizobiaceae, Enterobacteriaceae y Sphingomonadaceae.

A nivel de género, contrario a lo esperado, tampoco se observaron diferencias marcadas en los patrones de composición entre las condiciones de *Bd* detectado y no detectado. Al filtrar los resultados para visualizar los seis géneros más abundantes, se identificaron como dominantes: *Vibrio*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Alishewanella*, *Stenotrophomonas* y *Enterobacter*, sin diferencias aparentes en su distribución entre grupos (Ver Figuras 8-10).

Consideraciones sobre la variabilidad observada

Los resultados de los análisis de abundancias sugieren que la composición bacteriana cutánea de las salamandras estudiadas no presenta diferencias sustanciales asociadas a la detección de *Bd*, al menos en términos de abundancias relativas de los taxones dominantes. La elevada variabilidad interindividual observada dentro de cada grupo podría estar enmascarando diferencias más sutiles, o bien indicar que los cambios asociados a la presencia de *Bd* no se manifiestan en alteraciones de la abundancia de los taxones mayoritarios, sino en modificaciones de taxones menos abundantes o en las interacciones ecológicas entre ellos.

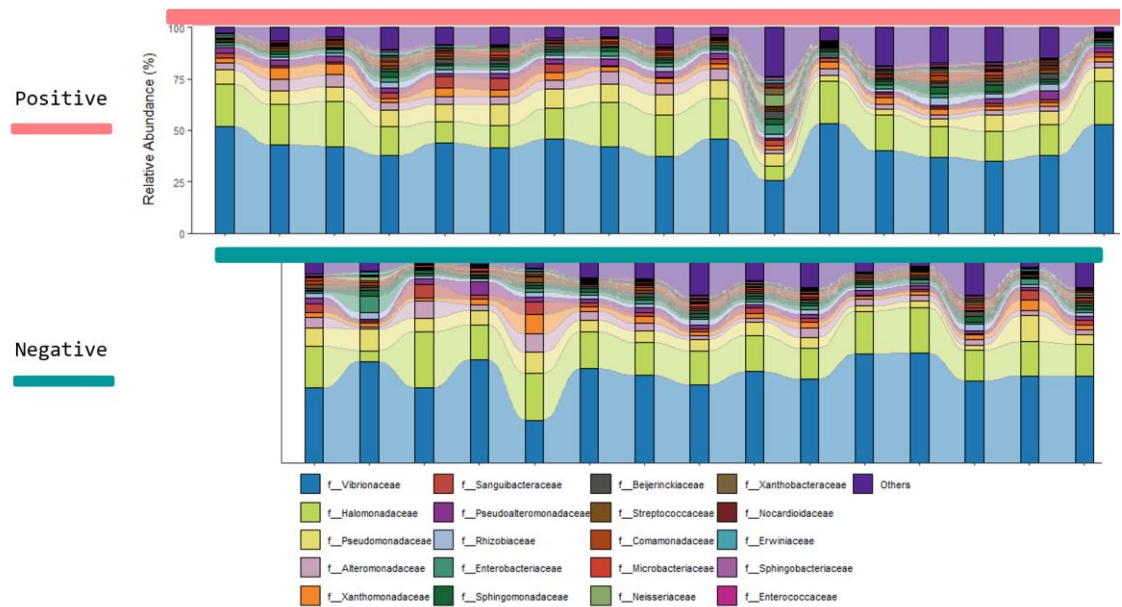


Figura 8. Las abundancias a nivel de familia. Esta figura muestra las diferencias en las abundancias relativas correspondientes a los dos grupos de condiciones positivas para *Bd* (rosa) y negativas para *Bd* (verde). Los demás colores en las barras apiladas representan a nivel de familia los microorganismos presentes en cada muestra. Dentro de las primeras 9 familias representadas, se encuentran: Vibrionaceae (azul), Halomonadaceae (verde), Pseudomonadaceae (amarillo), Alteromonadaceae (rosa), Xanthomonadaceae (naranja), Sanguibacteraceae (rojo) y Pseudoalteromonadaceae (púrpura), Rhizobiaceae (azul cielo) y Enterobacteriaceae (verde). Las barras intermedias con transparencia representan los cambios en la abundancia relativa entre cada muestra. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

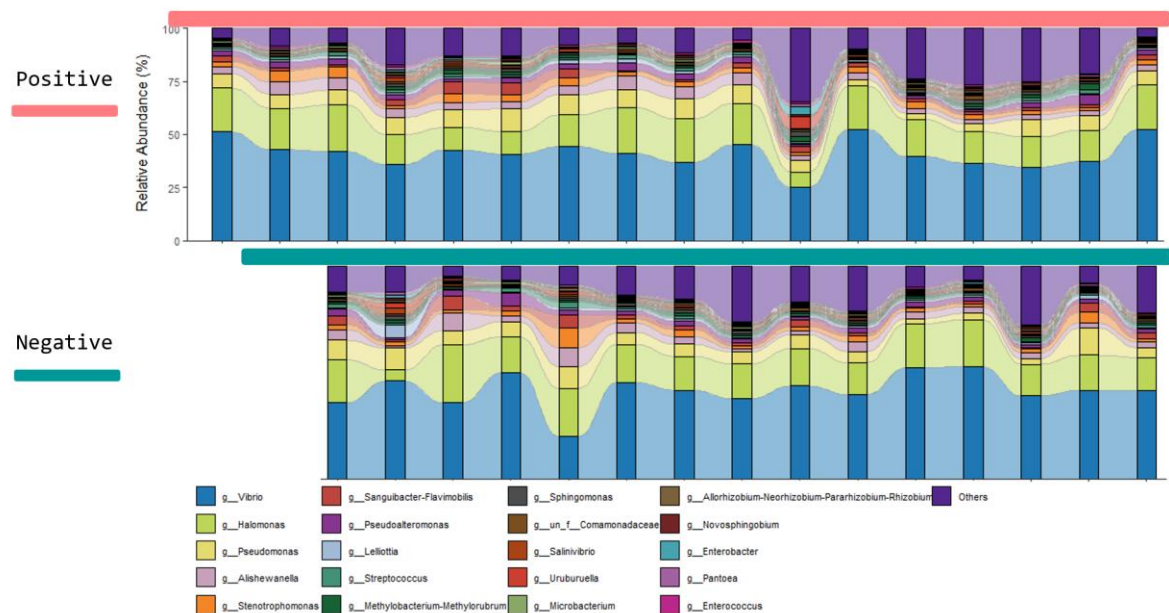


Figura 9. Las abundancias a nivel de género. Esta figura muestra las diferencias en las abundancias relativas correspondientes a los dos grupos de condiciones positivas para *Bd* (rosa) y negativas para *Bd* (verde). Los demás colores en las barras apiladas representan a nivel de género los microorganismos presentes en cada muestra. Dentro de los géneros representados, se encuentran: *Vibrio* (azul), *Halomonas* (verde), *Pseudomonas* (amarillo), *Alishewanella* (rosa), *Stenotrophomonas* (naranja), *Sanguibacter-Flavimobilis* (rojo) y *Pseudoalteromonas* (púrpura), *Lelliottia* (azul cielo), *Streptococcus* (verde), *Methylobacterium* (verde), *Sphingomonas* (negro), Comamonadaceae (café), *Salinivibrio* (marrón), *Uruburuella* (rojo), *Microbacterium* (verde), *Allorhizobium* (café), *Novosphingobium* (rojo oscuro), *Enterobacter* (cian), *Pantoea* (violeta) y *Enterococcus* (fucsia). Las barras intermedias con transparencia representan los cambios en la abundancia relativa entre cada muestra. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

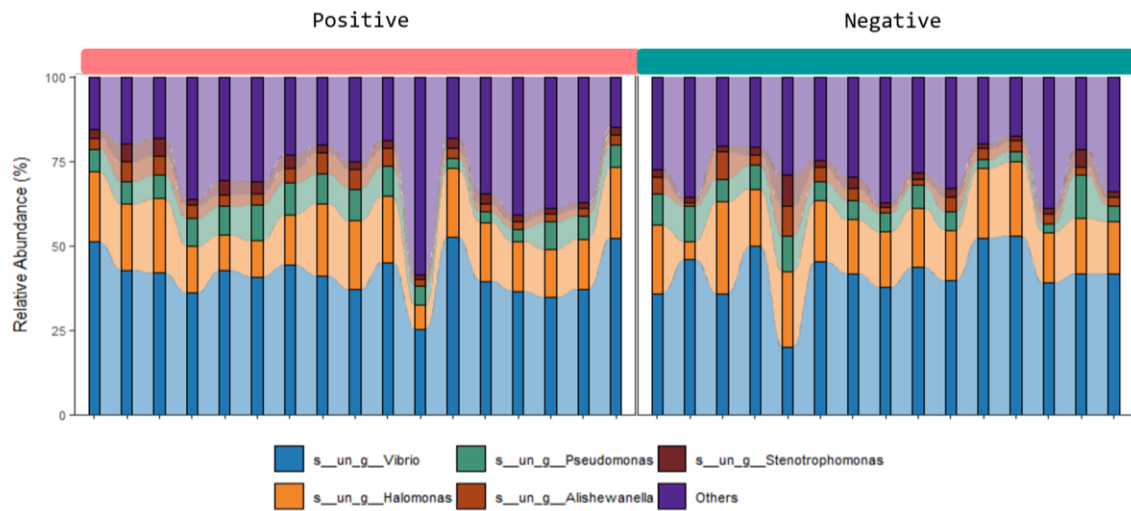


Figura 10. Abundancias top 5 nivel de género. Esta figura muestra las diferencias en las abundancias relativas correspondientes a los dos grupos de condiciones positivas para *Bd* (rosa) y negativas para *Bd* (verde). Se muestra únicamente el top 5, se codificó para especies, sin embargo, la asignación sólo llegó a género. Los demás colores en las barras apiladas representan a nivel de género los microorganismos presentes en cada muestra. Dentro de los géneros representados, se encuentran: *Vibrio* (azul), *Halomonas* (naranja), *Pseudomonas* (verde), *Alishewanella* (naranja), *Stenotrophomonas* (marrón) y otros géneros (morado). Las barras intermedias con transparencia representan los cambios en la abundancia relativa entre cada muestra. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

Análisis de diversidad

Patrones de similitud y disimilitud entre condiciones

Se exploraron los patrones de similitud y disimilitud en la composición bacteriana entre las condiciones de *Bd* detectado y no detectado. Los resultados no revelaron un patrón claro de agrupamiento asociado a la condición de salud en términos de distancias filogenéticas. La

representación gráfica mediante dendrogramas mostró una intercalación de muestras de ambas condiciones (representadas en azul y naranja), sin una segregación definida por grupo (Ver Figuras 11, 12).

El análisis de abundancias por muestra a nivel de phylum evidenció una marcada heterogeneidad interindividual, independientemente de la condición de detección de *Bd*. Los phyla Myxococcota, Acidobacteriota, Firmicutes y Bacteroidota presentaron abundancias relativas bajas en la mayoría de las muestras, mientras que Proteobacteria y Actinobacteriota fueron consistentemente los taxones dominantes en todas las muestras, sin distinción por condición de salud (Figuras Suplementarias 1-6).

A nivel de familia, Halomonadaceae y Vibrionaceae presentaron las mayores abundancias relativas de manera consistente en todas las muestras. Otras familias como Xanthomonadaceae, Alteromonadaceae y Pseudomonadaceae mostraron abundancias variables entre muestras, con incrementos o disminuciones independientes de la condición de detección de *Bd*. Por el contrario, familias como Sphingobacteriaceae y Nocardioideae presentaron las menores abundancias relativas en el conjunto de muestras analizadas (Figuras Suplementarias 1-6).

Diversidad beta

Para evaluar las diferencias en la estructura comunitaria entre condiciones, se calculó la diversidad beta mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis, cuyos valores oscilan entre 0 (composición idéntica) y 1 (composición completamente diferente).

Los resultados del análisis de diversidad beta no evidenciaron una separación clara entre las condiciones de salud. En la representación gráfica, los valores de disimilitud entre muestras fueron relativamente bajos, representados por círculos pequeños y de coloración clara. Asimismo, las distancias filogenéticas representadas en los extremos del dendrograma no mostraron diferencias marcadas entre condiciones, lo que indica una similitud composicional entre ambos grupos (Ver Figura 11). El patrón de agrupamiento de las muestras, calculado con base en su similitud, no mostró una segregación específica por condición de salud, con

muestras de ambos grupos (*Bd* positivo y negativo) distribuidas de manera intercalada (Ver Figura 12).

Diversidad alfa

Se evaluaron múltiples índices de diversidad alfa para comparar la riqueza y equitatividad de las comunidades microbianas entre condiciones. Los índices calculados incluyeron:

- **Chao1**: estimador de riqueza que considera taxones raros.
- **ACE** (*Abundance-based Coverage Estimator*): estimador de riqueza basado en cobertura.
- **Shannon**: índice que integra riqueza y equitatividad.
- **Simpson**: índice que pondera la dominancia de taxones abundantes.
- **Pielou**: índice de equitatividad que evalúa la uniformidad en la distribución de abundancias.

Independientemente de la métrica utilizada, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los índices de diversidad alfa entre los grupos definidos por la condición de detección de *Bd*. Este análisis fue realizado considerando el conjunto total de muestras, sin estratificación por especie de salamandra (Ver Figura 12).

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

El análisis de ordenación mediante PCoA basado en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis no reveló una separación entre las muestras según su condición de salud. Las muestras de individuos con y sin detección de *Bd* se distribuyeron de manera solapada en el espacio de ordenación, sin conformar agrupamientos diferenciados.

Interpretación de los resultados de diversidad

En conjunto, los análisis de diversidad alfa y beta sugieren que las comunidades microbianas cutáneas de las salamandras estudiadas presentan una composición general similar entre individuos con y sin detección de *Bd*. Estos resultados indican que, al menos a nivel de la

estructura comunitaria global, la presencia del patógeno no se asocia con cambios detectables en la diversidad o composición del microbioma cutáneo. No obstante, esta aparente similitud composicional no descarta la existencia de diferencias funcionales o de interacciones ecológicas entre taxones que podrían ser relevantes para la susceptibilidad o resistencia a la infección (Ver Figuras 11 y 12).

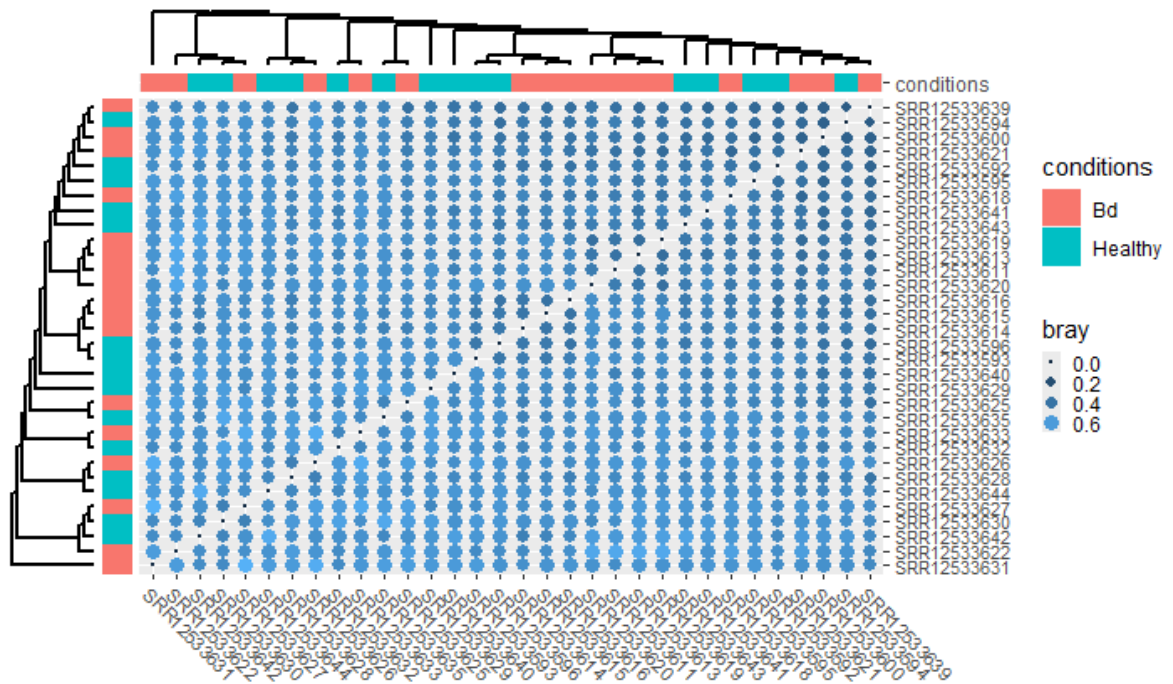


Figura 11. Matriz de distancias por condición. El siguiente heatmap muestra las distancias calculadas por el método Bray-Curtis (árboles en los extremos) para cada muestra por condición de detección positiva o negativa a *Bd* como las distancias de los microorganismos encontrados por muestra. La escala del color azul y el tamaño de los puntos dentro del gráfico están representando el valor de Bray calculado para cada muestra. Entre más parecidas son las muestras entre sí por condición, el color y tamaño del círculo dentro del gráfico será más pequeño y de un tono de azul más intenso. Cada muestra está etiquetada con un prefijo SRR y un número. Las categorías de salud están mostradas como *Healthy*, que son las muestras

negativas en la detección de *Bd* (en color cian) y *Bd* (en color rosa) que son todas aquellas muestras que tuvieron una detección positiva de la infección.

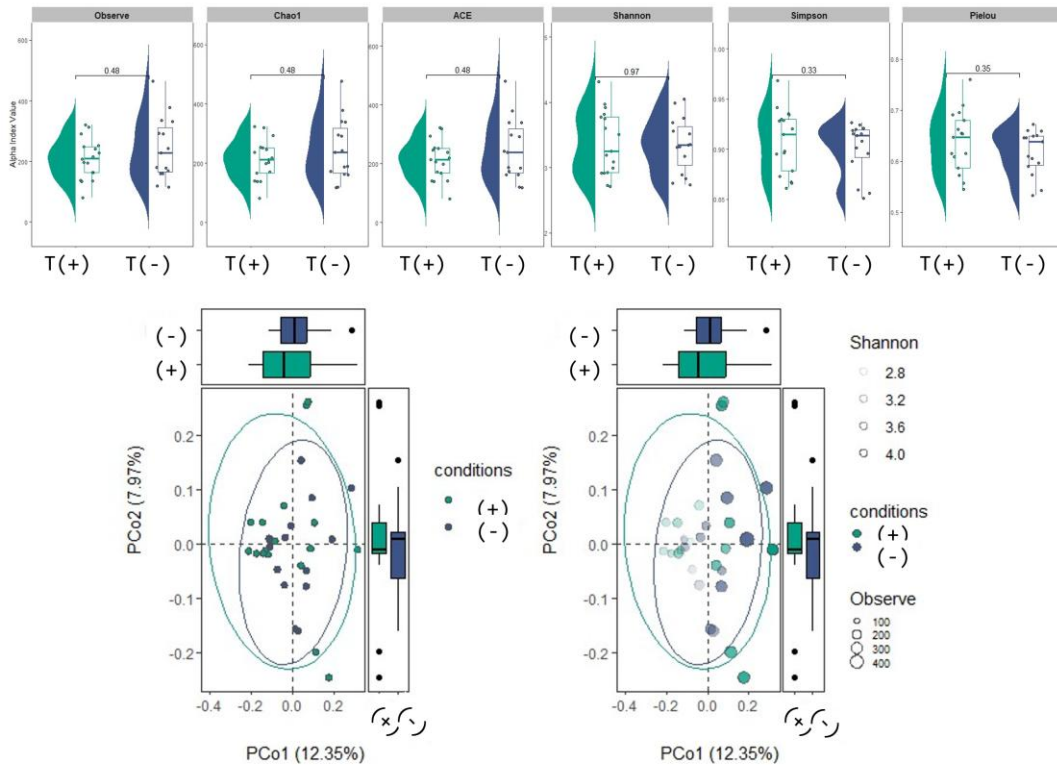


Figura 12. Análisis de PCoA (Diversidad beta). El siguiente gráfico muestra los resultados del análisis de ordenamiento, para las condiciones *Bd* detectado (positivo +) y *Bd* no detectado (negativo -) tomando en cuenta los resultados del índice de diversidad de Shannon como las transparencias en los círculos de las muestras. El número de especies observadas se indica en el gráfico como el tamaño de los puntos. Los gráficos de barras están comparando la variabilidad de las condiciones con respecto a su ordenamiento, el índice de Shannon y el número de especies observadas. Además, se muestran los índices Alfa para el conjunto de muestras por condición: Observado, Chao1, ACE, Shannon, Simpson y Pielou sin diferencias significativas. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Comparación estadística de disimilitudes

Se realizó una comparación estadística de las distancias de Bray-Curtis intra e intergrupo, evaluando las disimilitudes dentro de cada condición (*Bd* positivo vs. *Bd* positivo; *Bd* negativo vs. *Bd* negativo) y entre condiciones (*Bd* positivo vs. *Bd* negativo). Los resultados no revelaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas, lo que refuerza la observación de que ambos grupos presentan una estructura comunitaria similar a nivel composicional.

Identificación de taxones diferencialmente abundantes

Ante la ausencia de diferencias marcadas en los análisis de diversidad y composición general, se procedió a identificar taxones específicos que pudieran distinguir entre las condiciones de salud mediante aproximaciones de mayor resolución.

Análisis LEfSe

Se empleó el análisis LEfSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*), el cual combina pruebas estadísticas no paramétricas con la estimación del tamaño del efecto para identificar taxones diferencialmente abundantes entre condiciones. El procedimiento consiste en dos etapas: primero, se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para identificar taxones con diferencias significativas entre grupos; posteriormente, se realiza un Análisis Discriminante Lineal (LDA) que asigna un puntaje a cada taxón, reflejando la magnitud de la diferencia entre condiciones. Convencionalmente, valores de LDA ≥ 2 se consideran biológicamente relevantes para discriminar entre grupos (Ver Figura 13).

*Taxones asociados a individuos sin detección de *Bd**

En los individuos con resultado negativo para *Bd*, se identificaron al menos ocho taxones diferenciales con puntajes de LDA ≥ 2 . Entre estos se encontraron:

- Familia Enterobacteriaceae
- Género *Lelliottia*

- Familia Solimonadaceae
- Orden Salinisphaerales
- Género *Elizabethkingia*
- Familia Cryomorpaceae

Taxones asociados a individuos con detección de *Bd*

En los individuos con resultado positivo para *Bd*, se identificó un mayor número de taxones diferenciales con puntajes de LDA ≥ 2 , incluyendo:

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| ● Familia Microbacteriaceae | ● Familia Roseiflexaceae |
| ● Género <i>Methylobacterium</i> | ● Género <i>Aureimonas</i> |
| ● Género <i>Shinella</i> | ● Género <i>Paucibacter</i> |
| ● Orden Frankiales | ● Género <i>Altererythrobacter</i> |
| ● Género <i>Amnibacterium</i> | ● Familia Blastocatellaceae |
| ● Género <i>Xylophilus</i> | ● Género <i>Chloronema</i> |
| ● Orden Chloroflexales | ● Familia Burkholderiaceae |
| | ● Género <i>Lautropia</i> |

Los resultados completos del análisis LEfSe se presentan en las Figuras Suplementarias 7-9.

Validación de abundancias de taxones marcadores

Con el objetivo de corroborar los resultados del análisis LEfSe, se extrajeron las abundancias de los taxones identificados como marcadores para compararlas entre condiciones de manera directa. Este análisis confirmó los patrones identificados por LEfSe (Ver Figura 13). Por ejemplo, el género *Methylobacterium*, identificado como marcador de la condición *Bd* positivo, presentó efectivamente una mayor abundancia en individuos con detección del patógeno en comparación con los individuos negativos. De manera concordante, la familia Enterobacteriaceae, identificada como marcador de la condición *Bd* negativo, mostró abundancias más elevadas en los individuos sin detección de *Bd*.

Estos resultados sugieren que, aunque la estructura comunitaria global del microbioma cutáneo no difiere sustancialmente entre condiciones, existen taxones específicos cuyas abundancias se asocian de manera diferencial con la presencia o ausencia de *Bd*, los cuales podrían estar relacionados con mecanismos de susceptibilidad o resistencia a la infección.

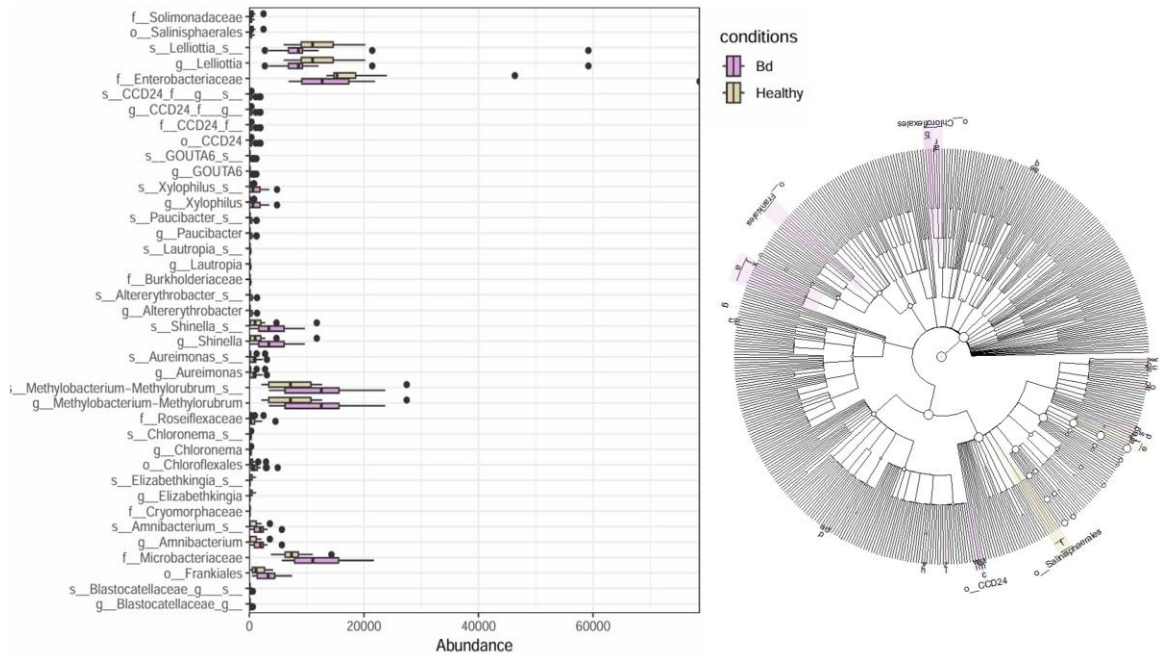


Figura 13. Las abundancias de biomarcadores. El siguiente gráfico muestra las abundancias de cada biomarcador encontrado con el análisis LEfSE. Las etiquetas de cada bacteria encontrada como biomarcador están a nivel de g_ (género), f_ (familia), el color que representa a cada condición: con la infección positiva: *Bd* (rosa) y con la infección no detectada: Healthy (beige). Así mismo se muestra el cladograma que representa dichos resultados. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

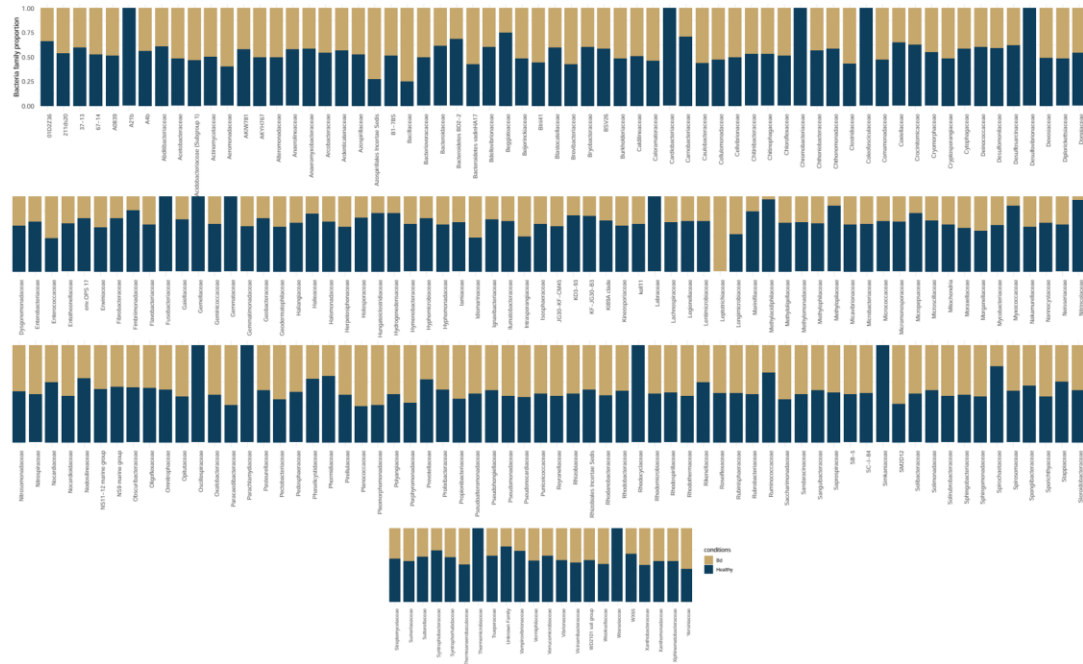


Figura 14. Identificación de biomarcadores por ANCOM-BC nivel familia. Se muestra la identificación de biomarcadores en ambas condiciones *Bd* positivo en color rosa, que representa a los animales detectados con la infección, y *Bd* negativo en color beige, que representa a los animales que no tuvieron la infección. Las barras muestran la proporción de cada familia de bacterias de acuerdo con la condición. Aquellas barras que sobrepasan el 50%, pueden considerarse como significativas para la condición dada. Así mismo, las barras que alcanzan un 100% también son significativas para el grupo o condición que la presenta. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Análisis ANCOM-BC

Como aproximación complementaria para la identificación de taxones diferencialmente abundantes, se aplicó el método ANCOM-BC (*Analysis of Compositions of Microbiomes*

with Bias Correction). Este método permite identificar taxones cuyas abundancias difieren significativamente entre condiciones, corrigiendo el sesgo composicional inherente a los datos de secuenciación de amplicones (Ver Figura 14 y 15).

Familias con abundancias diferenciales

El análisis ANCOM-BC identificó múltiples familias bacterianas que presentaron cambios en sus abundancias entre las condiciones de *Bd* detectado y no detectado (Ver Figura 14 y 15).

Familias asociadas a individuos con detección de Bd

En los individuos con resultado positivo para *Bd*, se identificaron familias cuyas abundancias incrementaron en un rango del 50% al 100% respecto a la condición negativa. Entre estas se encuentran:

Abditibacteriaceae, Acetobacteraceae, Actinomycetaceae, Azospirillaceae, Bacteroidetes (a nivel de clase), BD2-2, Beijerinckiaceae, Blastocatellaceae, Burkholderiaceae, Caloramatoraceae, Caulobacteraceae, Clostridiaceae, Cryptosporangiaceae, Devosiaceae, Enterococcaceae, Erwiniaceae, Geodermaphilaceae y Yersiniaceae, entre otras (Ver Figuras 13 y 14).

Familias asociadas a individuos sin detección de Bd

En los individuos con resultado negativo para *Bd*, se identificaron familias con incrementos en sus abundancias en un rango similar (60-100%). Entre estas se incluyen:

A21b, Abditibacteriaceae, Bacteroidetes (a nivel de clase), Beggiatoaceae, Blastocatellaceae, Carnobacteriaceae, Cardiobacteraceae, Coleofasciculaceae, Chromobacteriaceae, Desulfobacteraceae, Fusobacteraceae, Gemellaceae, Gemmatimonadaceae, Labraceae, Oscillospiraceae, Rhodocyclaceae, Spirochaetaceae, Thermomicrobiaceae y Woeseiaceae.

Validación estadística mediante el estadístico de Wald

Para determinar cuáles de las familias identificadas presentaban diferencias estadísticamente significativas, se aplicó el estadístico de Wald, implementado de manera predeterminada en ANCOM-BC. Este estadístico permite evaluar la significancia de las diferencias en abundancia entre condiciones, controlando la tasa de falsos positivos (Ver Figura 14 y 15).

Las familias que resultaron diferencialmente abundantes de manera estadísticamente significativa incluyeron:

- Deinococcaceae
- Omnitrophaceae
- Sumerlaeaceae
- Morganeliaceae
- Chitinibacteraceae
- Bdellovibrionaceae
- Clostridiaceae
- Burkholderiaceae
- Verrucomicrobiaceae
- Weeksellaceae
- Rhizobiaceae
- Streptococcaceae
- Moraxellaceae
- Comamonadaceae
- Caulobacteraceae

Los resultados completos del análisis ANCOM-BC se presentan en las Figuras Suplementarias 7-9.

Integración de resultados LEfSe y ANCOM-BC

Es importante señalar que algunos taxones fueron identificados como diferencialmente abundantes por ambos métodos (LEfSe y ANCOM-BC), lo que incrementa la confianza en su asociación con las condiciones de salud evaluadas (Ver Figura 13). Entre estos se encuentran las familias Burkholderiaceae, Clostridiaceae y Caulobacteraceae. La convergencia de resultados entre metodologías con fundamentos estadísticos distintos fortalece la identificación de estos taxones como potenciales biomarcadores asociados a la presencia o ausencia de *Bd* en el microbioma cutáneo de salamandras (Ver Figura 14).

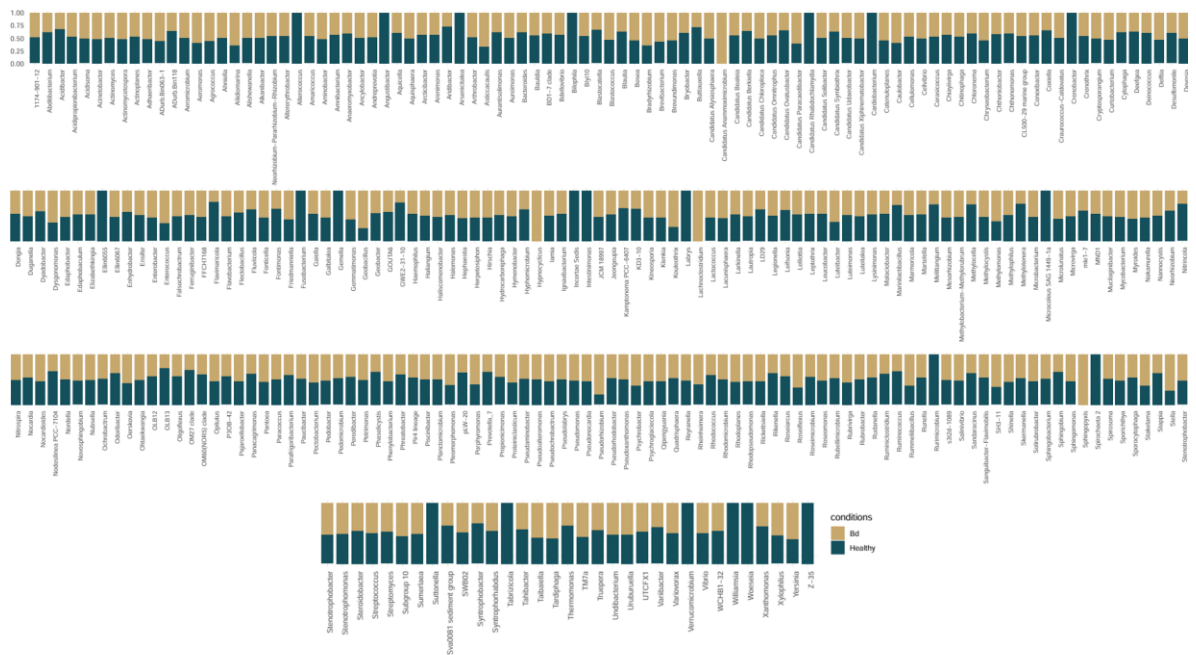


Figura 15. Identificación de biomarcadores por ANCOM nivel género. Se muestra la identificación de marcadores biológicos en ambas condiciones *Bd* positivo en color rosa, y *Bd* negativo en color beige. Las barras muestran la proporción de cada género de bacteria de acuerdo con la condición. Aquellas barras que sobrepasan el 50% pueden considerarse como significativas para la condición dada. Así mismo, las barras que alcanzan un 100% también son significativas para el grupo o condición que la presenta. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Análisis ANCOM-BC a nivel de género

De manera complementaria al análisis a nivel de familia, se aplicó el método ANCOM-BC para identificar géneros bacterianos con abundancias diferenciales entre las condiciones de *Bd* detectado y no detectado (Ver Figura 15).

Géneros con cambios en abundancia

El análisis reveló géneros que presentaron incrementos en sus proporciones de hasta el 100% en cada condición respecto a la condición opuesta.

Géneros asociados a individuos con detección de *Bd*

En los individuos con resultado positivo para *Bd*, los siguientes géneros mostraron incrementos sustanciales en su abundancia:

Candidatus Anammoximicrobium
Geobacillus
Hydrogenoclostridium
Lachnoclostridium
Sphingopyxis

Géneros asociados a individuos sin detección de *Bd*

En los individuos con resultado negativo para *Bd*, se identificaron géneros con incrementos de hasta el 100% en su abundancia respecto a la condición positiva:

<i>Alterococcus</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Angustibacter</i>	<i>Gemella</i>
<i>Bilophila</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Williamsia</i>
<i>Crenobacter</i>	<i>Woeseia</i>

Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 15.

Validación estadística mediante el estadístico de Wald

Para determinar cuáles de los géneros identificados presentaban diferencias estadísticamente significativas entre condiciones, se aplicó el estadístico de Wald. Este análisis identificó los siguientes géneros como diferencialmente abundantes de manera significativa:

Mycobacterium, *Uruburuella*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Aminobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Acidibacter*, *Streptococcus*, *Rickettsiella*, *Caulobacter*, *Leucobacter*, *Amnibacterium*, *Abditibacterium*, *Pseudoxanthomonas*, *Deinococcus*, *Roseomonas*, *Thermomonas* y *Sphingomonas* (Figuras Suplementarias 7-9).

Concordancia entre niveles taxonómicos

Es relevante destacar la consistencia observada entre los análisis realizados a nivel de familia y género. Varios de los géneros identificados como diferencialmente abundantes pertenecen a familias que también fueron señaladas como significativas en el análisis previo. Por ejemplo, el género *Caulobacter* pertenece a la familia Caulobacteraceae, y *Methylobacterium* a la familia Beijerinckiaceae, ambas identificadas previamente como diferenciales. Esta concordancia entre niveles taxonómicos refuerza la robustez de los resultados obtenidos (Ver Figuras 13-15).

Adicionalmente, algunos géneros identificados mediante ANCOM-BC coinciden con los detectados por el análisis LEfSe, como es el caso de *Methylobacterium* y *Amnibacterium*, lo cual proporciona mayor confianza en su papel como potenciales biomarcadores asociados a la condición de detección de *Bd*.

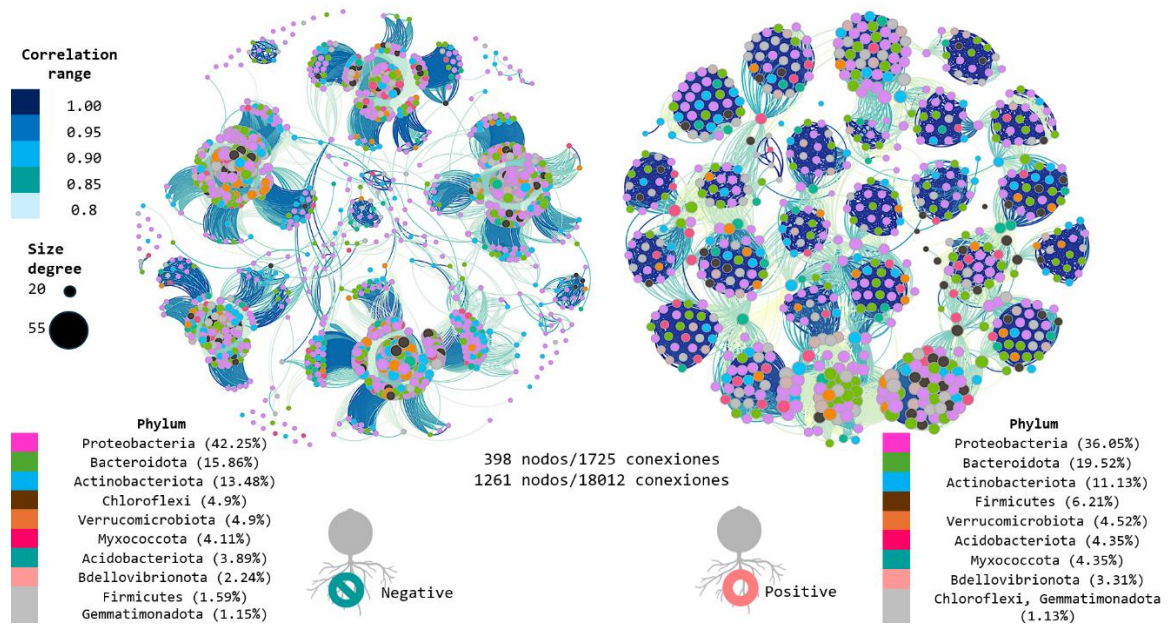


Figura 16. Red de microbiota para animales negativos a *Bd*. Se muestran las redes inferidas para el caso de todos los animales que tuvieron como resultado una detección negativa de la infección por el hongo quítrido. Esta red fue construida a nivel de Phylum, por lo que todos los phylum aquí representados como nodos (círculos) dentro del gráfico corresponden a microorganismos de este phylum si tienen el mismo color. Los colores indican el phylum, las correlaciones calculadas por el método de Pearson con un threshold de 0.8 se muestran (líneas) en un degradado de color rosa dependiendo del threshold. El tamaño del nodo dependerá del grado y tiene un rango de 20 a 55 conexiones. Las proporciones de cada phylum encontrado en esta condición se muestran en paréntesis. Al gráfico se le aplicó una distribución de Fruchterman Reingold y la detección de comunidades se realizó por el método de Louvain. También se graficaron las correlaciones positivas y negativas (verde y rojo respectivamente). *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Para evaluar diferencias estructurales entre comunidades microbianas, se infirieron redes de co-ocurrencia/co-abundancia por condición (Bd⁻ vs. Bd⁺). A diferencia de otros resultados presentados previamente, en este caso se observa una variación marcada en la arquitectura global de las redes, lo que sugiere una reorganización de las interacciones microbianas asociada al estado de infección (Ver Figura 16).

En los individuos negativos a Bd⁻, la red muestra una estructura claramente modular, caracterizada por un alto número de clústeres bien definidos. Este patrón indica la presencia de subcomunidades de microorganismos con asociaciones internas relativamente cohesivas. De forma adicional, las correlaciones entre phyla, aun cuando involucran linajes taxonómicamente distintos, son particularmente fuertes, lo que sugiere una conectividad robusta entre grupos filogenéticos diferentes. Notablemente, cada módulo conserva un patrón relativamente consistente en términos de tamaño (número de nodos), morfología y composición taxonómica, lo que podría interpretarse como evidencia de estructuras comunitarias estables y potencialmente redundantes desde una perspectiva funcional (Ver Figura 16).

En cuanto a la distribución de conectividad, se observa que una fracción considerable de nodos presenta grados elevados en ambas redes. Esto implica la existencia de nodos altamente conectados (potenciales *hubs*), con tamaños asociados a aproximadamente 30 conexiones por nodo según la visualización utilizada. La presencia de hubs y modularidad suele asociarse con comunidades donde coexisten interacciones locales fuertes (dentro de módulos) y puentes entre módulos, lo cual puede influir en la estabilidad ecológica, la propagación de perturbaciones y la resiliencia de la comunidad.

Respecto a la composición por phylum en la condición Bd⁻, se observó un predominio de Proteobacteria, con 42.35% de abundancia relativa. En segundo lugar, se ubicó Bacteroidota con 15.86%, seguido por Actinobacteriota con 13.48%. Posteriormente se identificaron Chloroflexi y Verrucomicrobiota, ambos con 4.9%, y finalmente Firmicutes con 1.59%. Este perfil sugiere una comunidad dominada por Proteobacteria, pero con una contribución relevante de phyla típicamente asociados a funciones metabólicas complementarias (por

ejemplo, degradación de polisacáridos, metabolismo secundario y procesamiento de compuestos complejos), lo que puede influir tanto en la estructura de la red como en la capacidad del sistema para amortiguar perturbaciones (Ver Figura 16).

En la red correspondiente a los animales positivos a *Bd* (*Bd*⁺), se observa que los nodos también se organizan en clústeres, aunque con una fragmentación aparente mayor (mayor número de agrupamientos). Las aristas que conectan los nodos presentan correlaciones de alta intensidad, evidenciadas por la predominancia de enlaces con tonalidades más oscuras en la visualización. En términos de composición, se aprecia una dominancia consistente de nodos pertenecientes a Proteobacteria dentro de la mayoría de los clústeres. A diferencia de la condición *Bd*⁻, no se observan subestructuras jerárquicas evidentes (p. ej., “*sub-clústeres*” integrados dentro de módulos mayores), lo cual sugiere una organización menos estratificada y potencialmente más dispersa.

En cuanto a la distribución del grado, los nodos exhiben tamaños relativamente homogéneos y, en general, menores, lo que sugiere que la mayoría de los taxones presentan un número moderado de conexiones y que la red carece de hubs tan prominentes como los observados en *Bd*⁻. Esto es consistente con una red donde las interacciones positivas están más repartidas entre nodos, pero con menor concentración de conectividad en taxones específicos.

Respecto a la composición por phylum en *Bd*⁺, se observan proporciones distintas a la condición *Bd*⁻. En particular, Proteobacteria representa 36.05% (menor que en *Bd*⁻), seguido por Bacteroidota con 19.52%, Actinobacteriota con 11.13%, Firmicutes con 6.21% y Verrucomicrobiota con 4.2%, además de otros phyla con abundancias relativas inferiores al 2%. En conjunto, estos resultados indican una variación composicional leve pero consistente entre condiciones, compatible con un reacomodo comunitario asociado a la infección.

Comparación cuantitativa de conectividad a nivel de género

Para evaluar formalmente las diferencias estructurales entre condiciones, se calcularon las correlaciones positivas a nivel de género. En la red integrada de salamandras Bd⁻, se identificaron 315 correlaciones positivas y aproximadamente 111 nodos. En contraste, la red integrada de salamandras Bd⁺ presentó 165 correlaciones positivas y 129 nodos.

Este patrón —más nodos, pero menos conexiones en Bd⁺— sugiere que la infección podría asociarse con una pérdida neta de relaciones positivas (conectividad) que en el estado no infectado contribuyen a la cohesión de la comunidad. Desde una perspectiva ecológica de redes, una disminución marcada del número de aristas puede interpretarse como debilitamiento de asociaciones o ruptura de co-ocurrencias consistentes, lo cual es compatible con una comunidad sometida a perturbación (disbiosis), aun cuando mantenga riqueza o presencia de taxones.

En el mismo análisis se calcularon correlaciones negativas; sin embargo, estas no fueron visibles bajo el umbral (*threshold*) y el esquema de filtrado empleados. Por lo tanto, se concluyó que, a ese nivel de correlación y con los criterios de inclusión establecidos, no se detectaron interacciones negativas significativas en ninguna de las dos condiciones. Es importante señalar que esta conclusión es condicional al método y al umbral: la ausencia de enlaces negativos en la red final no implica necesariamente ausencia de relaciones negativas en el sistema biológico, sino que dichas señales pueden quedar por debajo del criterio estadístico/operacional definido.

Modularidad por especie y por condición

Posteriormente, se estimó la modularidad de las redes a nivel de género por especie. En salamandras Bd⁻, los valores de modularidad para *E. bislineata*, *Desmognathus* y *Notophthalmus* fueron 0.732, 0.742 y 0.814, respectivamente. *Eurycea* y *Desmognathus* mostraron valores muy similares, mientras que *Notophthalmus* presentó una modularidad

mayor, consistente con una organización comunitaria más compartimentalizada (Ver Figuras 17).

En salamandras Bd+, los valores estimados fueron 0.000, 0.695 y 0.851 para *Eurycea*, *Desmognathus* y *Notophthalmus*, respectivamente. Considerando la comparación entre estados de salud, se observa una disminución de la modularidad asociada a la infección en *Desmognathus* (0.742 → 0.695) y, de manera más marcada, en *Eurycea* (0.732 → 0.000). Este último resultado sugiere una pérdida severa de estructura modular detectable, aunque conviene interpretarlo con cautela, un valor de 0 puede reflejar también limitaciones del método de detección de comunidades dadas las propiedades específicas de esa red (por ejemplo, densidad, conectividad o tamaño efectivo), Ver Figura 17.

En contraste, para *N. viridescens* se observó un aumento ligero de modularidad de 0.814 a 0.851 ($\Delta = 0.037$). Este comportamiento diferencial podría indicar que la infección no afecta de forma uniforme la organización de la comunidad entre especies hospedero, y que en *Notophthalmus* la red podría reorganizarse hacia una estructura aún más compartimentalizada (por ejemplo, por expansión de módulos dominados por ciertos taxones), aunque esta interpretación debe sustentarse con métricas complementarias (p. ej., densidad, grado medio, distribución de grados, o centralidad de nodos clave), Ver Figura 17.

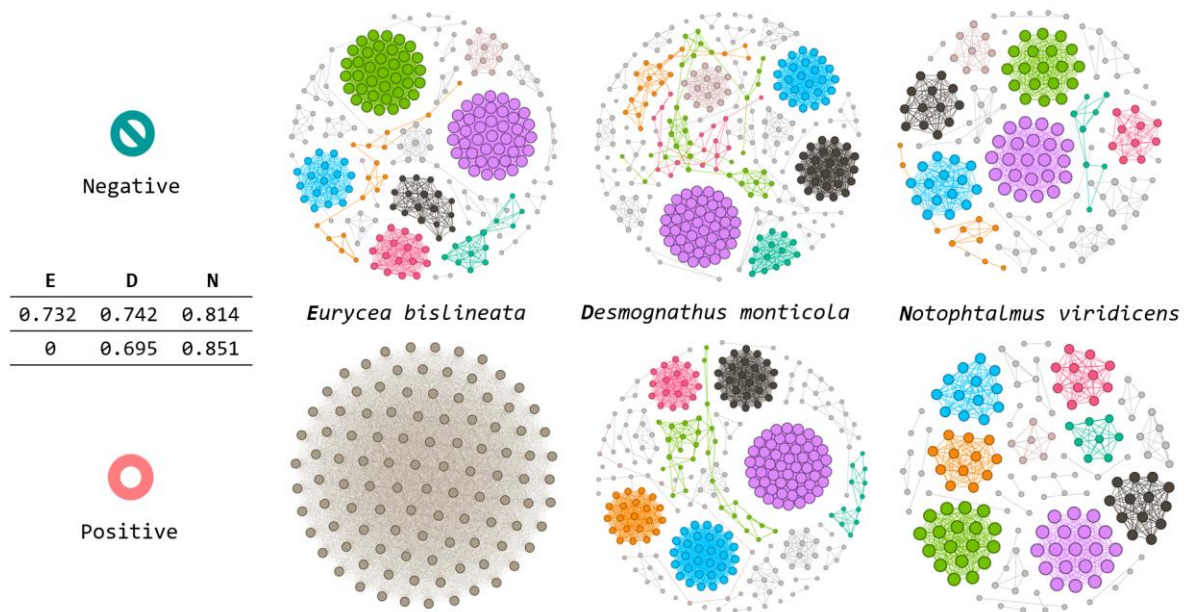


Figura 17. Estructura de las redes: Modularidad. La siguiente figura muestra las redes inferidas por cada especie de animal analizado: *E. bislineata*, *D. monticola* y *N. viridescens*, con *Bd* detectado (positivos) en la parte inferior y negativos a *Bd* en la parte superior. En el extremo izquierdo se muestra una tabla con los valores de modularidad calculados para cada red; las etiquetas corresponden a: E (*Eurycea*), D (*Desmognathus*), N (*Notophthalmus*). Cada una de las redes presenta un distinto grado de modularidad, lo que puede observarse directamente en las redes construidas. El método de inferencia utilizado fue Spearman. El tamaño del nodo en el gráfico es equivalente al respectivo *degree* en un rango de 20 a 55 conexiones. Las conexiones presentan colores aleatorios de acuerdo con el nodo de salida. Se tomaron en cuenta los nodos que tuvieran de una a más conexiones. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

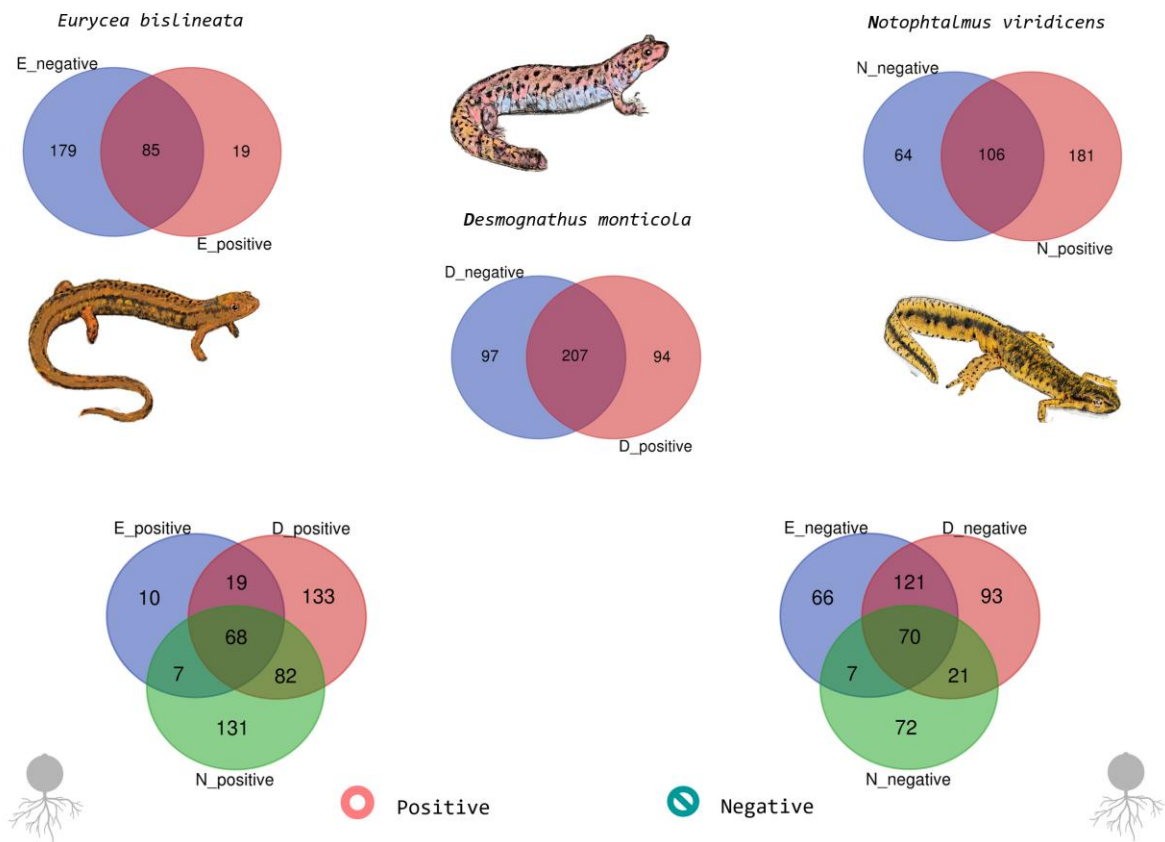


Figura 18. Comparación de la composición de microorganismos dentro de cada condición. Se muestran los respectivos diagramas de Venn para cada una de las especies de animales aquí analizadas por condición. (negativo) Corresponde a la etiqueta de los animales sin infección por *Bd* en color azul para todos los casos. En color rojo se muestran todos aquellos animales que tuvieron *Bd* (positivo). Cada prefijo utilizado N_, D_ E_ es la inicial del género del animal estudiado. Los valores en el círculo azul representan el número de bacterias propias de la condición sin *Bd*. Mientras que el número dentro de los círculos rojos representa el número de especies de bacterias propias de la condición positiva a la infección. La lista de especies utilizada para generar los gráficos es con respecto a los módulos encontrados en la figura _____. El número que se encuentra en el centro (intersección) de ambos círculos es el número de bacterias que tienen en común. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

Con el fin de evaluar si la infección por *Bd* se asocia con cambios en la composición taxonómica de las redes modulares inferidas (nivel de género), se extrajeron las listas de nodos (géneros bacterianos) presentes en cada red, separando por condición de salud (Bd– vs. Bd+) y por género de salamandra. Dado el gran volumen de taxones recuperados, las listas completas se presentan en tablas (Apéndice; ver Tabla/Anexo correspondiente), mientras que en el texto se reportan únicamente los totales, los patrones de solapamiento y algunos géneros representativos por su relevancia biológica o clínica (Ver Figura 18).

Eurycea

En *Eurycea*, la red asociada a individuos Bd– incluyó 179 géneros bacterianos, mientras que la red de individuos Bd+ incluyó 19 géneros. Este contraste sugiere una reducción marcada del repertorio de géneros detectables en la red bajo la condición Bd+ (consistente con una simplificación de la comunidad o con una pérdida de conectividad/robustez de las asociaciones). Entre los géneros presentes en Bd+ se identificaron taxones de interés ecológico y/o clínico como *Treponema*, *Wautersiella*, *Iodobacter* y *Chitinimonas*.

La comparación entre condiciones mostró la existencia de un subconjunto de géneros compartidos (intersección Bd– \cap Bd+), así como géneros exclusivos de cada condición. En el texto principal se destacan, por su frecuencia de reporte en microbiomas y/o relevancia biomédica, géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium* y *Legionella*, cuya presencia (y potencial reorganización) es consistente con escenarios de disbiosis o con cambios en oportunidades ecológicas durante la infección (Ver Figura 18 y 19).

Desmognathus

Para *Desmognathus*, se recuperaron 97 géneros en la condición Bd+ y 94 géneros en Bd–, lo que indica que el tamaño del repertorio taxonómico es comparable entre condiciones. Sin embargo, la similitud en riqueza no implica necesariamente estabilidad: en redes ecológicas

es común observar recambio composicional (géneros que desaparecen y otros que emergen) sin cambios drásticos en el número total de nodos. Por ello, además del conteo de géneros, se analizó el solapamiento entre condiciones y la presencia de géneros con posible relevancia funcional o patogénica. En este conjunto destacan, entre otros, miembros de *Clostridium sensu stricto*, así como géneros asociados a metabolismo anaerobio y degradación de compuestos complejos. El recambio taxonómico se interpreta juntamente con métricas topológicas (número de aristas, modularidad y distribución de grados, evitando inferencias basadas únicamente en abundancias (Ver Figura 18 y 19).

Notophthalmus

En *Notophthalmus*, ambas condiciones compartieron un núcleo amplio de géneros (intersección), dentro del cual aparecen repetidamente taxones bien conocidos como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium* y *Legionella*, además de múltiples géneros ambientales característicos de ambientes acuáticos o asociados a materia orgánica. Adicionalmente, se observó un marcado contraste en el número total de géneros detectados por condición (Bd- vs. Bd+), lo cual, en combinación con la reducción de aristas reportada para redes Bd+ (sección previa), sugiere que la infección no solo puede acompañarse de cambios en la composición, sino también de una reorganización de asociaciones positivas entre taxones, con implicaciones potenciales para la estabilidad y la compartimentalización de la comunidad microbiana (Ver Figura 18 y 19).

En conjunto, estos resultados muestran que el efecto de *Bd* sobre la microbiota cutánea (representada aquí como redes a nivel de género) no es uniforme entre hospedadores. En algunos casos (p. ej., *Eurycea*), la condición Bd+ se asocia con una reducción marcada del número de géneros presentes en la red, mientras que en otros (p. ej., *Desmognathus*) el número total de géneros es similar entre condiciones, pero con evidencia de recambio composicional. Estas diferencias deben interpretarse junto con las propiedades topológicas ya reportadas (pérdida neta de aristas en Bd+, variaciones de modularidad), dado que la transición hacia disbiosis puede expresarse tanto como cambios en quién está presente

utilizada para generar los gráficos es con respecto a los módulos encontrados en la figura __.

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Comparación global de taxones a nivel de género entre condiciones (Bd⁻ vs. Bd⁺)

Con el objetivo de sintetizar las diferencias composicionales a nivel de género entre salamandras sin infección detectable (Bd⁻) y con infección detectable (Bd⁺), se realizó una comparación global integrando todas las muestras disponibles, sin discriminar por especie de salamandra. Dado que el análisis se reporta a nivel taxonómico de género, en adelante se utilizarán los términos “géneros bacterianos” o “taxones a nivel de género” (en lugar de “bacterias”), para mantener precisión conceptual.

En esta comparación conjunta se observó que, independientemente del estado de infección, las salamandras comparten 44 taxones a nivel de género (intersección Bd⁻ ∩ Bd⁺). Para evitar que el texto principal se vuelva excesivamente descriptivo, la lista completa de estos 44 géneros se presenta en el Apéndice. En el cuerpo del capítulo se destacan únicamente algunos géneros ancla por su recurrencia y relevancia ecológica/biomédica, entre los cuales se encuentran: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Delftia*, *Halomonas* y *Stenotrophomonas*.

Posteriormente, se efectuó un análisis por condición. En las salamandras Bd⁺ se identificaron 68 taxones a nivel de género compartidos entre todas las especies incluidas. Mientras que en el texto se mantienen como referencia los mismos géneros ancla (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Delftia*, *Halomonas* y *Stenotrophomonas*), en tanto representan componentes recurrentes del conjunto compartido y facilitan la comparación entre secciones. De forma análoga, para el conjunto de salamandras Bd⁻ se encontraron 70 taxones a nivel de género compartidos (Ver página de disponibilidad de datos para las listas completas). En

la narrativa se preserva la mención de los géneros ancla antes enlistados, con fines de continuidad interpretativa.

Finalmente, es importante subrayar que el hecho de que existan taxones compartidos (44 entre condiciones, 68 en Bd+ y 70 en Bd-) no implica necesariamente equivalencia ecológica entre estados. En el marco del análisis de redes, la diferencia puede residir en cambios de abundancia relativa y/o en la reorganización estructural (centralidad, modularidad y pertenencia a módulos), y no únicamente en la presencia/ausencia de taxones. Por tanto, la interpretación biológica de estas intersecciones debe complementarse con métricas de red (por ejemplo, cambios en nodos centrales, pérdida/ganancia de enlaces, reconfiguración de módulos) para evaluar si ciertos géneros ancla incrementan su relevancia topológica o funcional bajo infección.

Con el fin de evaluar si los módulos de co-ocurrencia presentaban patrones comparables entre condiciones (Bd- vs. Bd+) y entre especies de salamandras, se analizó un módulo altamente denso por red, bajo el supuesto de que estos subcomponentes capturan asociaciones microbianas particularmente robustas. Para el género *Eurycea*, únicamente se consideró la red que mostró un valor de modularidad interpretable, a causa de que la ausencia de modularidad limita la identificación confiable de módulos funcionales.

El análisis reveló que las similitudes modulares son escasas y mayoritariamente restringidas a comparaciones pareadas, sin que se identificará un conjunto de taxones a nivel de género compartido de manera consistente entre todas las salamandras o entre ambas condiciones. Las coincidencias observadas ocurrieron principalmente dentro de la misma condición (por ejemplo, Bd- vs. Bd-), lo que sugiere que la estructura modular es altamente dependiente del contexto ecológico y del hospedero, y no responde a un patrón universal asociado únicamente a la presencia o ausencia de *Bd*. En consecuencia, no se procedió al análisis exhaustivo del resto de los módulos, dado que la falta de reproducibilidad global limita su interpretación comparativa.

Las coincidencias detectadas entre pares de redes incluyen géneros como *Devosia*, *Roseiarcus*, *Ensifer*, *Blyi10* y *1174-901-12*, así como asociaciones adicionales entre

Desmognathus Bd⁺ y Bd⁻ (por ejemplo, *Haliangium*, *Psychrobacter*, *Nocardioides* y *Shinella*). Dado que la resolución taxonómica alcanzada fue predominantemente a nivel de género —aun tras intentar forzar la asignación a especie mediante DECIPHER—, estos resultados deben interpretarse como indicadores de agrupamientos taxonómicos generales, más que como evidencia de linajes específicos con funciones patogénicas o protectoras definidas.

Desde un punto de vista ecológico, la ausencia de módulos compartidos entre condiciones sugiere que la infección por *Bd* no reconfigura simplemente la microbiota cutánea mediante la sustitución de unos pocos géneros clave, sino que podría inducir reorganizaciones estructurales más profundas en las asociaciones microbianas. Esto es consistente con escenarios en los que la perturbación afecta las interacciones entre taxones, más que su presencia individual.

Redes Core

Para explorar esta posibilidad, se analizó el subconjunto de correlaciones más fuertes (redes *core*), incrementando el umbral de correlación con el fin de capturar asociaciones potencialmente más estables. Las redes *core* mostraron diferencias marcadas entre condiciones. En salamandras Bd⁻ se observó un mayor número de correlaciones fuertes ($\approx 0.9-1$), con 280 conexiones y 65 nodos, además de una distribución relativamente homogénea de grado entre nodos. Este patrón es compatible con una red con mayor redundancia estructural, donde múltiples taxones participan en asociaciones intensas, lo que podría conferir una mayor robustez frente a perturbaciones (Ver Figura 20).

En contraste, la red *core* de salamandras Bd⁺ presentó menos conexiones (96) y menos nodos (35), con correlaciones de menor magnitud ($\approx 0.7-0.8$) y una distribución de grado más heterogénea, en la que solo algunos nodos concentran una proporción significativa de las conexiones. Este patrón es consistente con una centralización de la red bajo condiciones de estrés, en la que la pérdida de asociaciones fuertes reduce la redundancia y vuelve a la comunidad potencialmente más vulnerable a perturbaciones adicionales (Ver Figura 20).

En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la infección por *Bd* se asocia no solo con cambios en la composición microbiana, sino con una reconfiguración de la arquitectura de interacciones, caracterizada por una disminución de la conectividad fuerte y una posible pérdida de estabilidad ecológica. Bajo este marco, las diferencias entre condiciones podrían residir principalmente en abundancias relativas, centralidad de nodos y estructura de módulos, más que en la simple presencia o ausencia de taxones a nivel de género, lo que refuerza la pertinencia de enfoques basados en redes para el estudio de la disbiosis asociada a *Bd*.

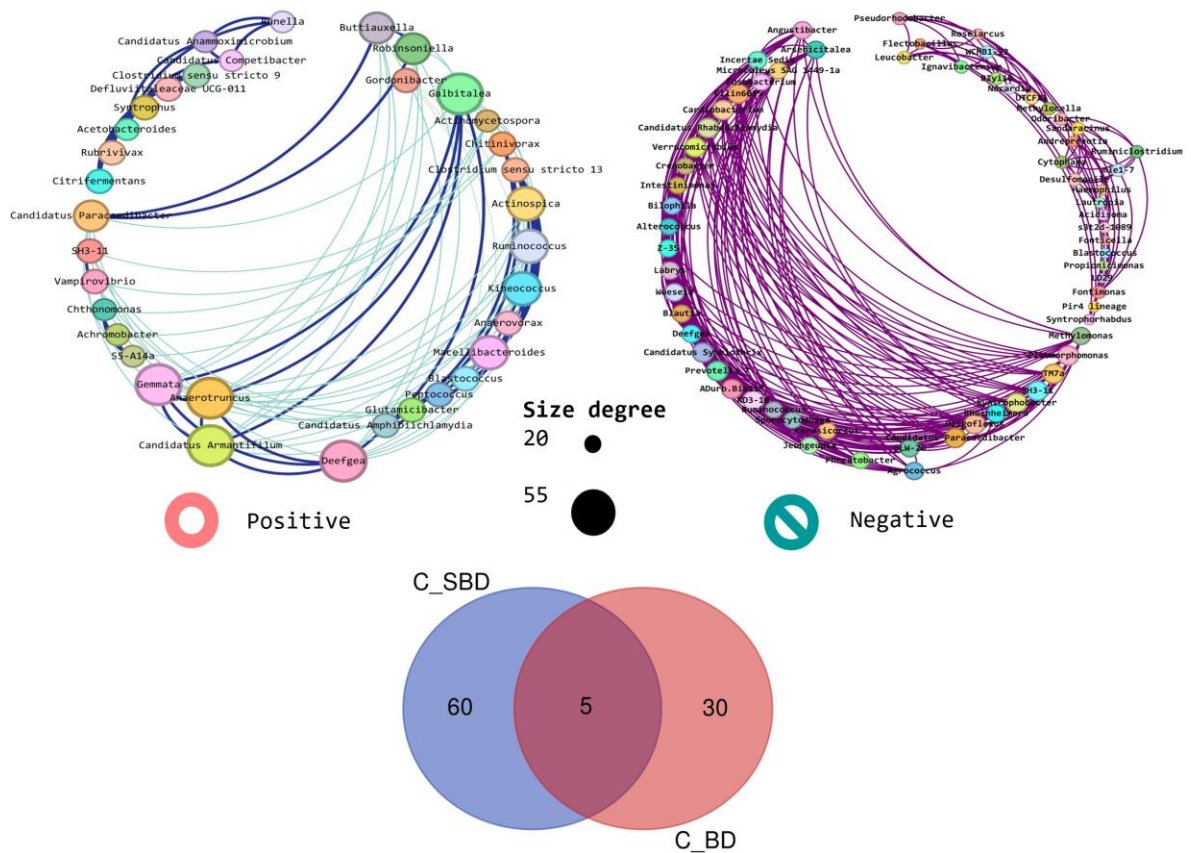


Figura 20. Red core para animales con y sin infección. Esta figura presenta las redes inferidas para cada condición (Negativa a *Bd*) o (positiva a *Bd*) sin distinción de la especie

de animal analizada. Cada nodo representa el nombre del género de la bacteria y el tamaño del nodo va de acuerdo con el grado del nodo en un rango de 20 a 55 conexiones. Se aplicó el método de correlación de Spearman para la inferencia de estas redes y se aplicó también un threshold de 1 para encontrar las conexiones con mayor fuerza y significancia en cada condición. Las conexiones presentan distintas tonalidades de acuerdo con el threshold (0.9 a 1) en degradado de azul para los animales con detección positiva a *Bd* y rosa para los animales con una detección negativa a *Bd*. La intensidad y grosor de las conexiones son dependientes del threshold. Se hizo un filtrado de las conexiones por grado; aquellos nodos con menos de 3 conexiones no fueron tomados como relevantes para el gráfico. El diagrama de Venn está construido para la lista de bacterias presentes en cada grupo de animales dependiendo de la condición C_SBD (sin *Bd* o negativo a la infección) y C_BD (con *Bd* o positivo a la infección). Los círculos azul y rojo representan cada red core y sus componentes y la intersección representa aquellos componentes que comparten ambos grupos. Los valores en cada sección de los círculos partes externas o en el centro representan el número de componentes totales para cada grupo y el número de componentes compartidos. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Al comparar la composición de los taxones a nivel de género que conforman las redes *core*, ver Figura 20, se observó que ambas condiciones —salamandras *Bd*⁻ y *Bd*⁺— comparten únicamente cinco géneros bacterianos: *Blastococcus*, *Ruminococcus*, *Candidatus*, *Paracaedibacter* y *Deefgea*. Esta coincidencia mínima indica que la fracción central de la red, definida por asociaciones fuertes y potencialmente estables, difiere de manera sustancial entre estados de salud, lo que sugiere una reorganización profunda del núcleo interactivo de la microbiota asociada a la infección por *Bd*.

La red *core* de salamandras sin infección (*Bd*⁻) presentó una composición diversa y heterogénea, integrada por géneros asociados a distintos nichos metabólicos, incluidos taxones aerobios, anaerobios y fermentadores. Entre los géneros más representativos se

encuentran *Oligoflexus*, *Crenobacter*, *Nocardia*, *Phreatobacter*, *Methylomonas*, *Fonticella*, *Leucobacter*, *Roseiarcus*, *Prevotella* (grupo *Prevotella_7*), *Pleomorphomonas*, *Jeongeupia*, *Ruminiclostridium*, *Desulfomonile*, *Microcoleus*, *Cerasicoccus*, *Cytophaga*, *Bilophila*, *Sandaracinus*, *Odoribacter*, *Intestinimonas*, *Syntrophobacter*, *Verrucomicrobium*, *Woeseia*, *Agrococcus*, *Methylocella*, *Flectobacillus*, *Sporocytophaga*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Ignavibacterium*, *Blautia* y *Rheinheimera*, entre otros (lista completa en Apéndice).

En contraste, la red *core* de salamandras con infección por *Bd* (Bd+) mostró una composición notablemente distinta, caracterizada por la presencia de géneros frecuentemente asociados a ambientes anaerobios, procesos fermentativos y consorcios microbianos especializados. Entre los taxones identificados se encuentran *Candidatus Anammoximicrobium*, *Candidatus Armantifilum*, *Peptococcus*, *Chthonomonas*, *Candidatus Competibacter*, *Citrifermentans*, *Gemmata*, *Actinospica*, *Kineococcus*, *Acetobacteroides*, *Gordonibacter*, *Robinsoniella*, *Clostridium sensu stricto* (grupos 9 y 13), *Rubrivivax*, *Syntrophus*, *Chitinivorax*, *Anaerovorax*, *Vampirovibrio*, *Candidatus Amphibiichlamydia*, *Buttiauxella*, *Anaerotruncus*, *Runella*, *Achromobacter*, *Macellibacteroides*, *Glutamicibacter* y *Actinomycetospora*.

La escasa superposición entre redes *core* refuerza la idea de que la infección por *Bd* no implica únicamente la pérdida o ganancia marginal de algunos géneros, sino una reconfiguración del conjunto de interacciones más fuertes, que podría reflejar una alteración en la estabilidad ecológica y en la redundancia funcional de la microbiota cutánea.

Posteriormente, se analizó la distribución de propiedades topológicas de las redes en función de la condición de salud (Bd⁻ vs. Bd⁺) y de la categoría de susceptibilidad a la infección de cada especie de salamandra. Las métricas evaluadas fueron *Degree*, *Neighborhood Connectivity*, *Eccentricity* y *Clustering Coefficient*. Para este análisis se aplicó una ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey, con el fin de identificar diferencias significativas entre grupos (Ver Figura 21).

Al comparar a *Notophthalmus* (especie considerada susceptible) y *Eurycea* (especie tolerante), ambas en condición negativa a *Bd*, se detectaron diferencias significativas en el *Degree*, indicando que los nodos de la red de *Eurycea* presentan, en promedio, un mayor número de conexiones. De manera consistente, la métrica *Neighborhood Connectivity* también mostró valores significativamente más altos en *Eurycea*, lo que sugiere una mayor interconectividad entre vecinos inmediatos en esta especie. Las métricas restantes (*Eccentricity* y *Clustering Coefficient*) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies bajo esta condición (Ver Figura 21).

Estos resultados indican que, en ausencia de infección por *Bd*, las redes microbianas de *Notophthalmus* y *Eurycea* comparten una arquitectura topológica globalmente similar, aunque *Eurycea* presenta un patrón de conectividad local ligeramente más denso. Desde una perspectiva ecológica, este incremento en el número de conexiones por nodo y en la conectividad entre vecinos podría traducirse en una mayor redundancia estructural, lo que potencialmente contribuiría a una mayor tolerancia frente a perturbaciones, sin que ello implique necesariamente diferencias en la composición taxonómica *per se*.

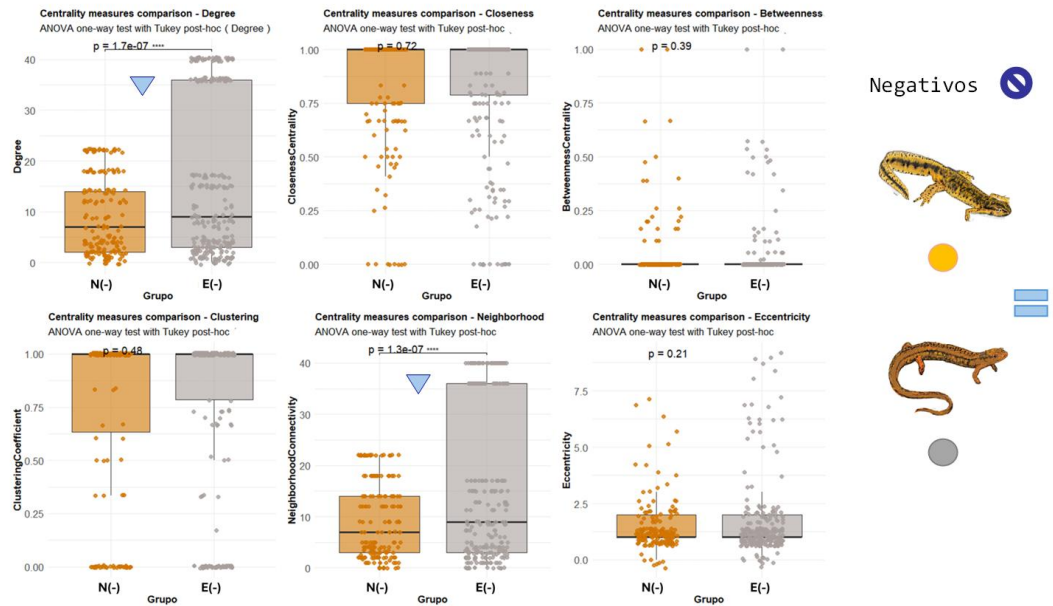


Figura 21. Comparación estadística de diferencias topológicas entre especies susceptibles y tolerantes. Esta figura presenta la comparación de los cálculos de centralidad realizados para cada una de las redes por condición. Las etiquetas (-) representan las redes de animales sin la infección por *Bd* detectada (negativos). La inicial N o E hace referencia a la inicial de la salamandra analizada: *Notophthalmus* o *Eurycea*. También los colores de las cajas del gráfico representan la especie de salamandra en naranja y gris. La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Las mismas especies de salamandras fueron analizadas siguiendo el procedimiento metodológico previamente descrito, restringiendo en este caso el análisis exclusivamente a las muestras positivas a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. La comparación entre *Notophthalmus* (especie susceptible) y *Eurycea* (especie tolerante) reveló diferencias significativas en prácticamente todas las propiedades topológicas evaluadas, con la única excepción de la métrica *Betweenness*.

En particular, los resultados indican que las redes correspondientes a *Eurycea* positivas a *Bd* presentan un mayor *Degree* promedio, lo que refleja un número más elevado de conexiones por nodo en comparación con *Notophthalmus*. De manera consistente, se observaron valores significativamente mayores en métricas asociadas a la estructura local de la red, como *Closeness*, *Neighborhood Connectivity* y *Clustering Coefficient*, lo que sugiere una mayor cercanía entre nodos, una interacción más intensa entre vecinos inmediatos y una mayor formación de clústeres en la microbiota cutánea de *Eurycea* bajo condición de infección (Ver Figura 21).

Asimismo, se detectaron diferencias en métricas relacionadas con la organización global de la red, indicando que la fragmentación estructural es más evidente en *Eurycea* que en *Notophthalmus* cuando ambas especies se encuentran infectadas. Este patrón sugiere que,

frente a la perturbación impuesta por *Bd*, la red microbiana de *Eurycea* no colapsa hacia una estructura simplificada, sino que mantiene —o incluso incrementa— su complejidad topológica mediante una reorganización interna.

En contraste, la métrica *Betweenness*, que identifica a los nodos puente o nodos clave responsables de conectar diferentes regiones de la red, no mostró diferencias significativas entre ambas especies. Esto indica que, aun en presencia de la infección, la posición relativa de los nodos centrales se conserva, sugiriendo la existencia de un núcleo funcional estable compartido entre redes. Dichos nodos suelen corresponder a géneros bacterianos con funciones ecológicas relevantes dentro del microbioma, ya sea en el mantenimiento de flujos de información, intercambio metabólico o regulación de interacciones microbianas (Ver Figura 22).

Desde una perspectiva ecológica de redes, estos resultados sugieren que *Eurycea* responde a la infección por *Bd* mediante una reorganización topológica que preserva la conectividad local y la modularidad, lo que podría conferir una mayor capacidad de amortiguamiento frente a la perturbación. En cambio, *Notophthalmus* exhibe una red con menor conectividad y cohesión, lo que podría traducirse en una mayor vulnerabilidad estructural ante el estrés impuesto por el patógeno. Importante hay que destacar que estas diferencias no se explican únicamente por la presencia o ausencia de ciertos géneros bacterianos, sino por cambios en la arquitectura de interacciones, particularmente en términos de conectividad, agrupamiento y redundancia estructural (Ver Figura 22).

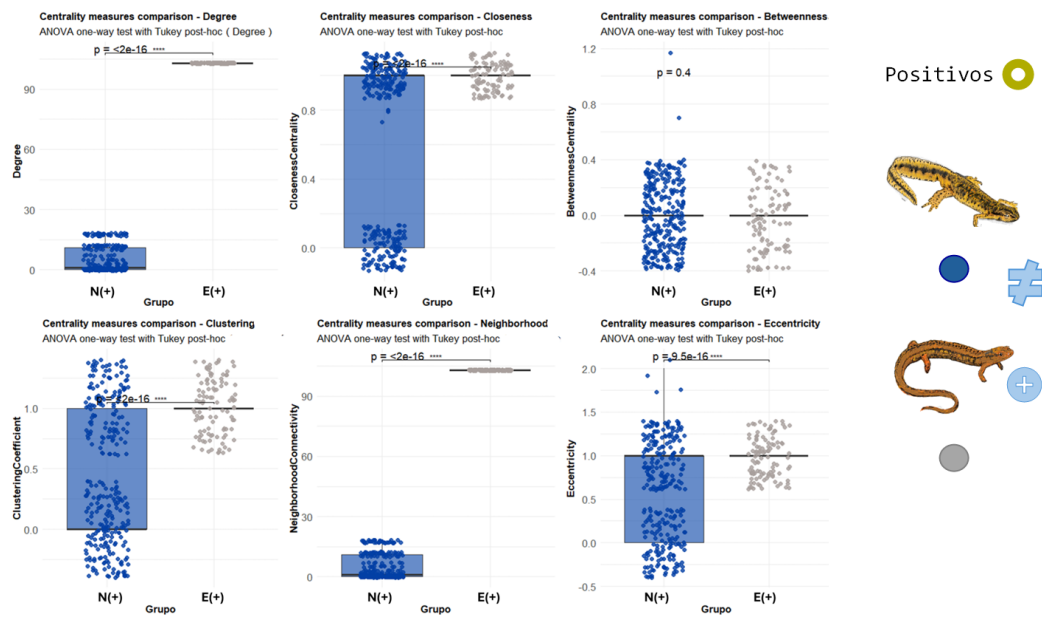


Figura 22. Comparación estadística de diferencias topológicas entre especies susceptibles y tolerantes. Esta figura presenta la comparación de los cálculos de centralidad realizados para cada una de las redes por condición. Las etiquetas (+) representan las redes de animales con la infección por *Bd* detectada (positivos). La inicial N o E hace referencia a la inicial de la salamandra analizada: *Notophthalmus* o *Eurycea*. También los colores de las cajas del gráfico representan la especie de salamandra en azul y gris. La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

Posteriormente, se analizaron las propiedades topológicas de las redes microbianas correspondientes a las especies de salamandra *Eurycea* y *Desmognathus*, ambas catalogadas como tolerantes o resistentes a la infección causada por *Batrachochytrium dendrobatidis*. El

análisis se realizó siguiendo el mismo procedimiento estadístico previamente descrito, permitiendo una comparación directa entre ambas especies bajo la condición negativa a *Bd*.

Los resultados indicaron que, para la mayoría de las métricas topológicas evaluadas, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies. Este patrón sugiere que *Eurycea* y *Desmognathus* comparten una arquitectura de red global similar cuando se encuentran en un estado de salud libre de infección, lo que es consistente con su clasificación ecológica como especies tolerantes o resistentes al patógeno (Ver Figura 23).

No obstante, se identificaron diferencias significativas en métricas específicas, particularmente en *Closeness* y *Eccentricity*. Estas métricas están asociadas, respectivamente, con la cercanía promedio entre los nodos de la red y con el grado de fragmentación o dispersión estructural de la misma. En este sentido, *Desmognathus* presentó valores que indican una mayor cercanía entre nodos, así como una mayor fragmentación relativa de la red microbiana en comparación con *Eurycea*.

Desde una interpretación ecológica de redes, estos resultados sugieren que, aun cuando ambas especies mantienen una estructura global comparable, *Desmognathus* exhibe una organización interna más compacta pero estructuralmente más fragmentada, lo que podría reflejar estrategias alternativas de organización del microbioma frente a condiciones ambientales similares. Esta diferencia podría estar relacionada con variaciones en la dinámica de interacción microbiana, en la redundancia funcional o en la forma en que la microbiota se distribuye espacialmente sobre la piel del hospedero, sin que ello implique necesariamente una desventaja frente a la infección (Ver Figura 23).

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de que la tolerancia o resistencia a *Bd* no depende de una única configuración topológica, sino que puede emerger a partir de múltiples arquitecturas de red funcionalmente viables, las cuales difieren en su organización fina, pero mantienen propiedades globales comparables.

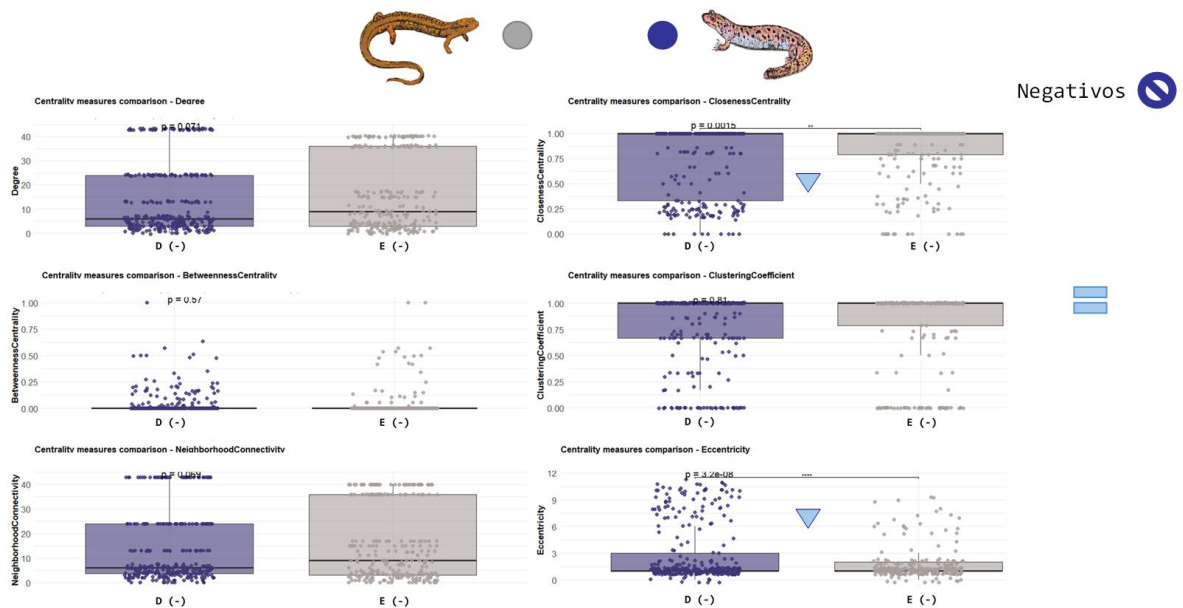


Figura 23. Comparación estadística de diferencias topológicas entre especies tolerantes. Esta figura presenta la comparación de los cálculos de centralidad realizados para cada una de las redes por condición. Las etiquetas (-) representan las redes de animales sin la infección por *Bd* detectada (negativos). La inicial D o E hace referencia a la inicial de la salamandra analizada: *Desmognathus* o *Eurycea*. También los colores de las cajas del gráfico representan la especie de salamandra en azul marino y gris. La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

El último análisis comparativo de las propiedades topológicas se llevó a cabo entre las salamandras *Desmognathus* y *Eurycea* bajo la condición positiva a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. Es importante recordar que ambas especies se encuentran clasificadas dentro del grupo de salamandras tolerantes a la infección, lo que permite evaluar

cómo especies con estrategias similares de tolerancia pueden diferir en la organización interna de su microbiota cutánea una vez establecida la infección (Ver Figura 24).

Los resultados estadísticos revelaron que, para todas las métricas topológicas analizadas, se detectaron diferencias significativas entre ambas especies. En particular, la red microbiana asociada a *Eurycea* mostró valores significativamente más altos de *Degree*, lo que indica un mayor número promedio de conexiones por nodo. De manera consistente, esta especie también presentó valores superiores en métricas asociadas a la cercanía entre nodos (*Closeness*), a la formación de clústeres (*Clustering Coefficient*) y la conectividad entre vecinos (*Neighborhood Connectivity*), lo que sugiere una red más densamente interconectada y localmente cohesionada (Ver Figura 24).

En contraste, la red microbiana de *Desmognathus* se caracterizó por una mayor fragmentación estructural, reflejada en métricas que indican una mayor dispersión de los nodos dentro de la red. Asimismo, esta especie presentó un mayor número de nodos centrales, lo que sugiere una organización más centralizada, en la cual un subconjunto reducido de nodos concentra un papel estructural clave en la conectividad global de la red.

Desde una perspectiva ecológica de redes, estos patrones indican que, aunque ambas especies toleran la infección por *Bd*, lo hacen a través de estrategias topológicas contrastantes. *Eurycea* parece mantener una red microbiana más robusta y redundante, con múltiples interacciones locales que podrían amortiguar la pérdida de nodos individuales. Por el contrario, *Desmognathus* exhibe una red más dependiente de nodos centrales, lo que podría implicar una mayor vulnerabilidad estructural ante perturbaciones dirigidas, pero también una posible eficiencia en la reorganización funcional bajo condiciones de estrés (Ver Figura 24).

En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la tolerancia a *Bd* no está asociada a una única arquitectura de red, sino que puede emerger a partir de configuraciones topológicas distintas, las cuales reflejan trayectorias ecológicas y microbianas específicas de cada especie hospedera.

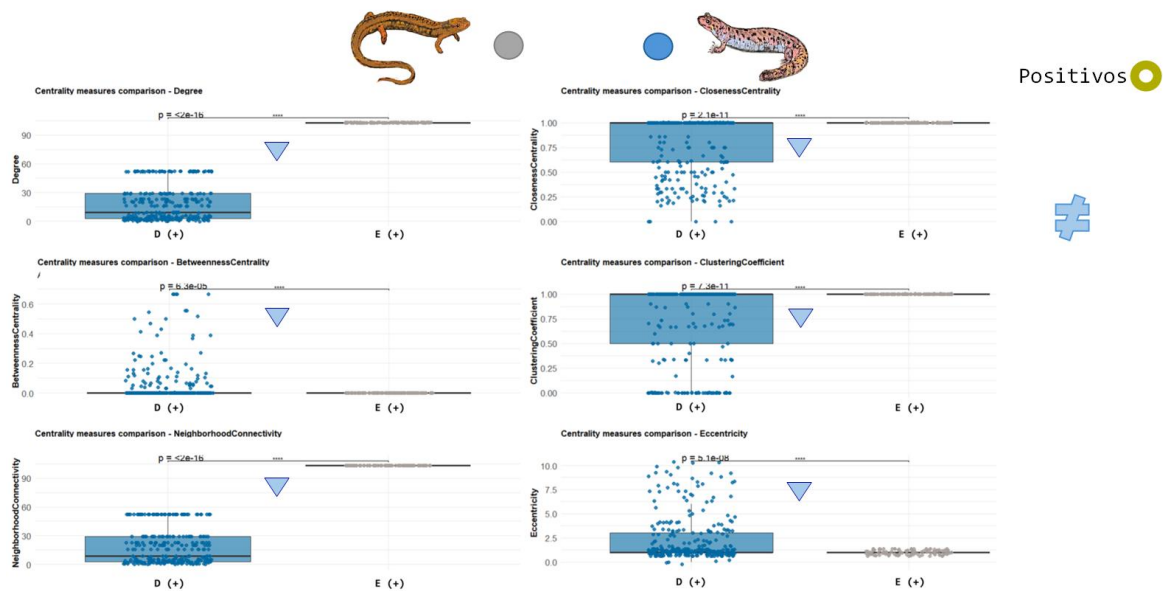


Figura 24. Comparación estadística de diferencias topológicas entre especies tolerantes. Esta figura presenta la comparación de los cálculos de centralidad realizados para cada una de las redes por condición. Las etiquetas (+) representan las redes de animales con la infección por *Bd* detectada (positivos). La inicial D o E hace referencia a la inicial de la salamandra analizada: *Desmognathus* o *Eurycea*. También los colores de las cajas del gráfico representan la especie de salamandra en azul marino y gris. La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

Análisis de robustez estructural de las redes microbianas cutáneas

El análisis de robustez se aplicó a las redes microbianas inferidas bajo ambas condiciones — salamandras positivas y negativas a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*— con

el objetivo de evaluar si la presencia del patógeno se asocia con un incremento en la vulnerabilidad estructural de la microbiota cutánea. Este enfoque permite cuantificar la pérdida progresiva de conectividad de la red frente a distintos esquemas de eliminación de nodos, proporcionando una medida funcional de estabilidad frente a perturbaciones.

Las redes fueron analizadas por condición y por especie de salamandra, y se sometieron a cuatro estrategias de remoción de nodos:

1. Eliminación aleatoria,
2. Eliminación dirigida por grado (*degree*),
3. Eliminación dirigida por intermediación (*betweenness*), y
4. Eliminación en cascada, un procedimiento en el cual la remoción de un nodo inicial desencadena la pérdida secundaria de nodos y enlaces que dependen estructuralmente de él, simulando un efecto dominó o *failure cascade*.

Todos los resultados se representaron gráficamente para comparar de manera directa las trayectorias de pérdida de conectividad entre redes y condiciones. En una primera aproximación, el análisis se centró en las dos redes globales inferidas por condición (*Bd* positivo vs. *Bd* negativo).

En el caso de las salamandras positivas a *Bd*, se observó un comportamiento altamente similar entre los métodos de eliminación por *degree* y en cascada. Ambos esquemas produjeron una pérdida aproximada del 75% de la conectividad al remover menos del 25% de los nodos. No obstante, la pendiente de la curva indica que esta pérdida no es inmediata ni abrupta, sino que presenta un retraso inicial, sugiriendo la presencia de redundancia estructural limitada. Al superar la remoción del 50% de los nodos, la red alcanza una meseta, indicando un colapso casi total, con una pérdida cercana al 99% de la conectividad, lo que evidencia una fragilidad estructural severa frente a ataques dirigidos (Ver Figura 25).

Para las salamandras negativas a *Bd*, se detectó un patrón cualitativamente similar en los métodos de eliminación por *degree* y en cascada, con una pérdida acelerada de conectividad a partir de la fracción 0.25 de nodos removidos. Sin embargo, al aplicar el método de

eliminación aleatoria, estas redes mostraron una mayor resistencia inicial, manteniendo una proporción relevante de conectividad frente a perturbaciones no dirigidas. Este resultado es consistente con una organización más distribuida, donde la pérdida de nodos al azar no compromete de manera inmediata la integridad global de la red (Ver Figura 25).

En conjunto, estos resultados indican que ambas redes son estructuralmente vulnerables a ataques dirigidos, particularmente aquellos que afectan nodos altamente conectados o que desencadenan efectos en cascada. No obstante, las redes correspondientes a salamandras sin infección exhiben una robustez relativamente mayor frente a perturbaciones aleatorias, lo que sugiere una mayor redundancia funcional y una arquitectura menos dependiente de nodos críticos.

Desde una perspectiva ecológica, estos patrones apoyan la hipótesis de que la infección por *Bd* se asocia con una reorganización de la microbiota hacia configuraciones más frágiles, donde la pérdida de nodos clave puede inducir un colapso rápido de la red. Así, la vulnerabilidad observada no depende únicamente de la composición microbiana, sino de la forma en que las interacciones están distribuidas y jerarquizadas dentro de la red (Ver Figura 25).

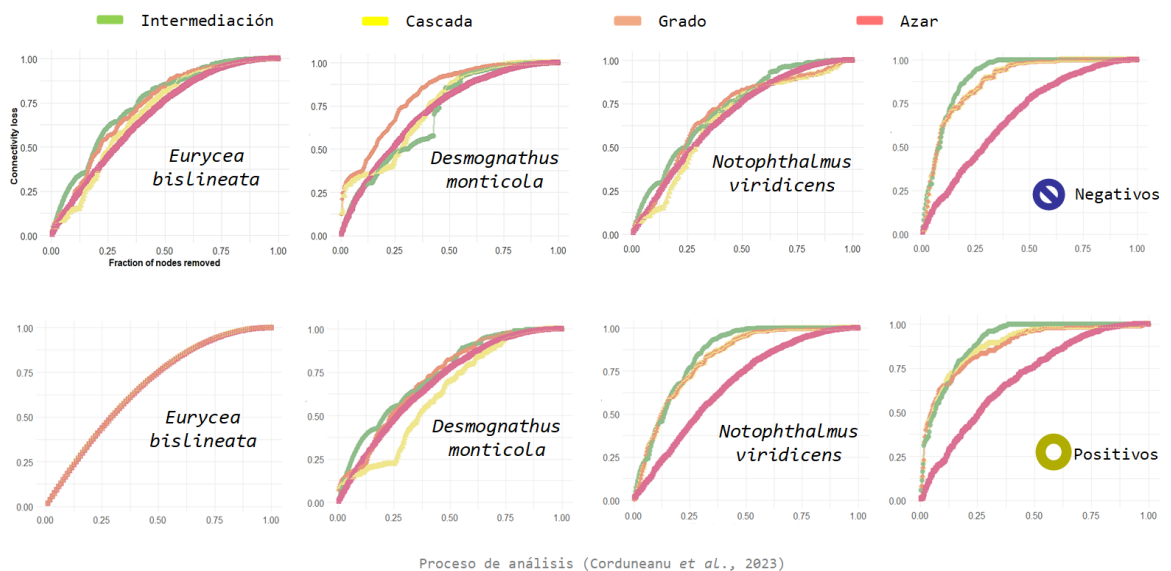


Figura 25. Análisis de robustez de las redes. Esta figura presenta los resultados del análisis de robustez para cada red inferida a nivel de género por condición de todos los animales (positiva) o (negativa) a *Bd*. Se representa en los gráficos la pérdida de conectividad que se da en la red debido a la fracción de nodos removidos de acuerdo con 4 métodos diferentes de remoción: por intermediación (color verde), por cascada (color amarillo), por *degree* (color naranja) y de manera azarosa (color rojo). La rapidez en la caída de la pendiente en cada curva de los gráficos representa una rápida pérdida de conectividad en las redes hasta cierta proporción delimitada por el eje Y. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez et al., 2026a.

Análisis de robustez por especie de salamandra y condición de infección

El mismo análisis de robustez se aplicó de manera independiente a cada especie de salamandra, separando las muestras de acuerdo con su condición de infección por *Bd* (*Bd* positivo y *Bd* negativo). Este enfoque permitió evaluar si la estabilidad estructural de la

microbiota cutánea depende no solo del estado de infección, sino también de la identidad del hospedero.

Salamandras negativas a Bd

En el análisis de las salamandras negativas a *Bd*, se observó que, para las cuatro estrategias de remoción de nodos (aleatoria, por *degree*, por *betweenness* y en cascada), las redes presentan un comportamiento relativamente robusto. Este patrón se refleja en una pendiente menos pronunciada en la pérdida de conectividad conforme se incrementa la fracción de nodos removidos (Ver Figura 25).

Si bien no puede afirmarse que estas redes sean completamente robustas —dado que eventualmente la conectividad se pierde—, los resultados indican un retraso considerable en el colapso estructural. En particular, la forma casi lineal de las curvas sugiere una relación aproximadamente proporcional entre la eliminación de nodos y la pérdida de conectividad. Este comportamiento es característico de redes en las que no existen nodos altamente centrales, sino que la mayoría de los nodos presentan una distribución relativamente homogénea del número de conexiones. Desde un punto de vista ecológico, esta arquitectura sugiere una alta redundancia funcional, donde múltiples taxones a nivel de género pueden desempeñar roles similares dentro de la red, reduciendo la dependencia de nodos específicos para mantener la cohesión estructural (Ver Figura 25).

Salamandras positivas a Bd

Para las salamandras positivas a *Bd*, se observó un comportamiento más heterogéneo. Las pendientes de las curvas de pérdida de conectividad no permiten identificar de forma inequívoca una red completamente robusta ni una completamente vulnerable. En este caso, los cuatro métodos de remoción de nodos mostraron un comportamiento muy similar únicamente en la especie *Eurycea*, mientras que las otras dos especies de salamandras presentaron respuestas diferenciadas dependiendo del método de eliminación (Ver Figura 25).

En particular, el método de remoción dirigido por *degree* produjo un patrón consistente en las tres especies: la pérdida de conectividad fue proporcional al número de nodos removidos, sin un colapso abrupto en etapas tempranas. Este resultado indica que, aunque las redes no colapsan de manera inmediata, sí presentan una vulnerabilidad estructural progresiva ante la eliminación de nodos altamente conectados. En otras palabras, la infección por *Bd* parece asociarse con una reducción en la redundancia estructural, haciendo que la red sea más sensible a perturbaciones dirigidas.

Para evaluar formalmente las diferencias en robustez entre las redes de salamandras positivas y negativas a *Bd*, se realizaron comparaciones estadísticas por pares para cada método de remoción. Los resultados mostraron diferencias significativas en tres de los cuatro métodos analizados: cascada, *degree* e intermediación, lo que confirma que la infección por *Bd* está asociada con cambios detectables en la respuesta estructural de las redes frente a perturbaciones (Ver Figura 25).

Comparación estadística considerando susceptibilidad del hospedero

Posteriormente, las muestras se compararon utilizando el enfoque modificado descrito por Corduneanu *et al.* (2023). De manera análoga al análisis de propiedades topológicas, se aplicó una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey, incorporando como factores la condición binaria de infección (*Bd* positivo vs. *Bd* negativo) y la categoría de susceptibilidad del hospedero (Ver Figura 26).

En una primera comparación, se contrastó a la salamandra *Eurycea* (clasificada como tolerante a la infección) con *Notophthalmus* (clasificada como susceptible). Para el caso de ambas especies en condición negativa a *Bd*, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los métodos de remoción de nodos. El método de eliminación aleatoria mostró un comportamiento prácticamente idéntico en todas las pruebas, independientemente de la especie o de la categoría de susceptibilidad.

En términos cuantitativos, ambas especies presentaron un porcentaje de pérdida de conectividad cercano al 75%, consistente entre métodos y condiciones, lo que sugiere que,

en ausencia de infección, la robustez estructural de la microbiota cutánea es comparable entre hospederos con distinta susceptibilidad (Ver Figura 26).

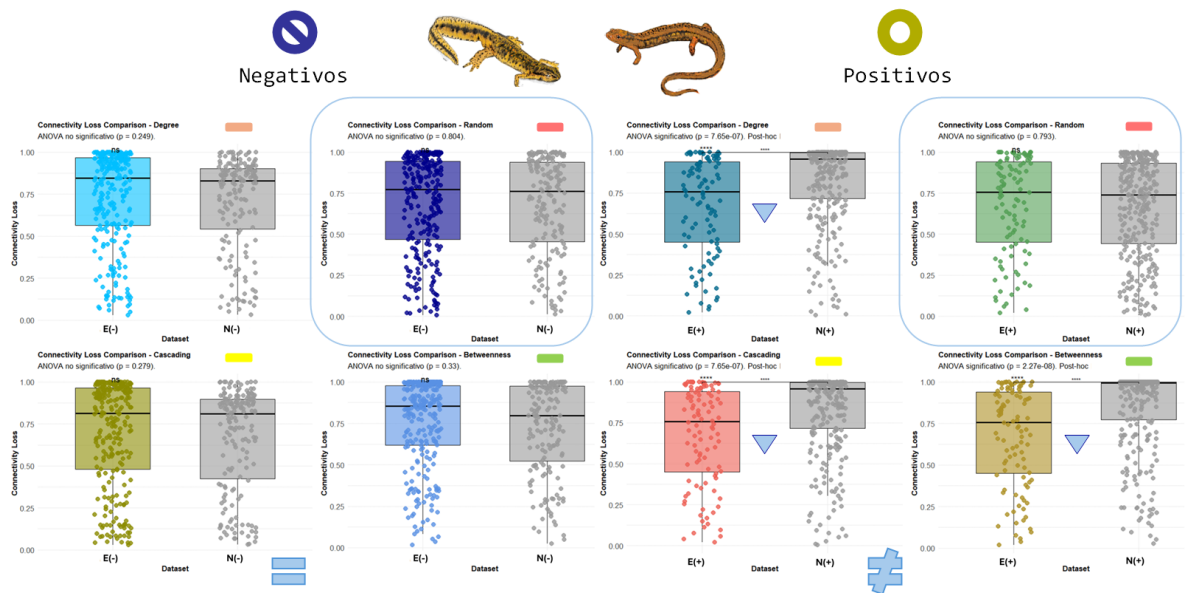


Figura 26. Comparativa del análisis de robustez de las redes entre especies susceptibles y tolerantes. Esta figura presenta la comparación estadística de cada uno de los métodos de remoción de nodos. En este caso se presenta el método cascada. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. Las etiquetas señalan las iniciales del grupo de salamandras estudiadas *Eurycea* (E) y *Notophthalmus* (N). Así mismo, la condición de los grupos está indicada por (+) para aquellos animales positivos en la detección de *Bd*, como (-) para aquellos animales que no presentaron *Bd*. La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a.

A continuación, se realizó la comparación entre salamandras susceptibles y salamandras tolerantes a la infección, considerando exclusivamente las muestras positivas a *Bd*. En este conjunto de pruebas estadísticas se observó que todos los métodos de remoción de nodos presentaron diferencias significativas entre ambas categorías de hospederos. En particular, la especie *Notophthalmus*, clasificada como susceptible a la infección, mostró una mayor vulnerabilidad estructural frente a la pérdida de conectividad bajo cualquier estrategia de remoción aplicada (Ver Figura 26).

Las redes correspondientes a *Notophthalmus* alcanzaron una pérdida de conectividad del 100% en tres de los cuatro métodos de eliminación de nodos, lo que indica un colapso casi completo de la estructura de la red ante perturbaciones dirigidas. Tal como se ha señalado previamente, el método de remoción aleatoria (*Random*) mantuvo valores similares de pérdida de conectividad en ambas especies, lo que sugiere que las diferencias observadas se manifiestan principalmente bajo escenarios de perturbación estructuralmente informada (Ver Figura 27).

En conjunto, estos resultados permiten sugerir que las redes microbianas cutáneas de los hospederos susceptibles presentan una menor robustez estructural cuando la infección por *Bd* está presente, lo que se traduce en una mayor sensibilidad a la eliminación de nodos clave y, potencialmente, en una menor capacidad de mantener la integridad funcional del microbioma bajo condiciones de estrés infeccioso.

Posteriormente, se llevó a cabo la comparación entre las dos especies de salamandras catalogadas como tolerantes a la infección, *Desmognathus* y *Eurycea*. En primer lugar, se analizaron las muestras negativas a *Bd*. En este caso, se identificaron diferencias significativas únicamente para el método de remoción por *degree*, donde la red correspondiente a *Desmognathus* mostró una mayor pérdida de conectividad, con valores aproximados entre 80 y 90%. Nuevamente, el método de remoción aleatoria presentó un comportamiento consistente con los análisis previos, manteniendo un porcentaje de pérdida de conectividad cercano al 75% en ambas especies, lo que indica una respuesta estructural similar frente a perturbaciones no dirigidas (Ver Figura 27).

La segunda parte de este análisis consistió en comparar a *Desmognathus* y *Eurycea* considerando únicamente las muestras positivas a *Bd*. En este escenario, las pruebas estadísticas no revelaron diferencias significativas entre las dos especies para ninguno de los métodos de remoción de nodos evaluados. Este resultado sugiere que, bajo condiciones de infección, ambas especies tolerantes convergen hacia un estado estructural comparable, caracterizado por niveles similares de vulnerabilidad y robustez frente a la pérdida de nodos, independientemente del tipo de perturbación aplicada (Ver análisis suplementario en sección correspondiente a Anexos).

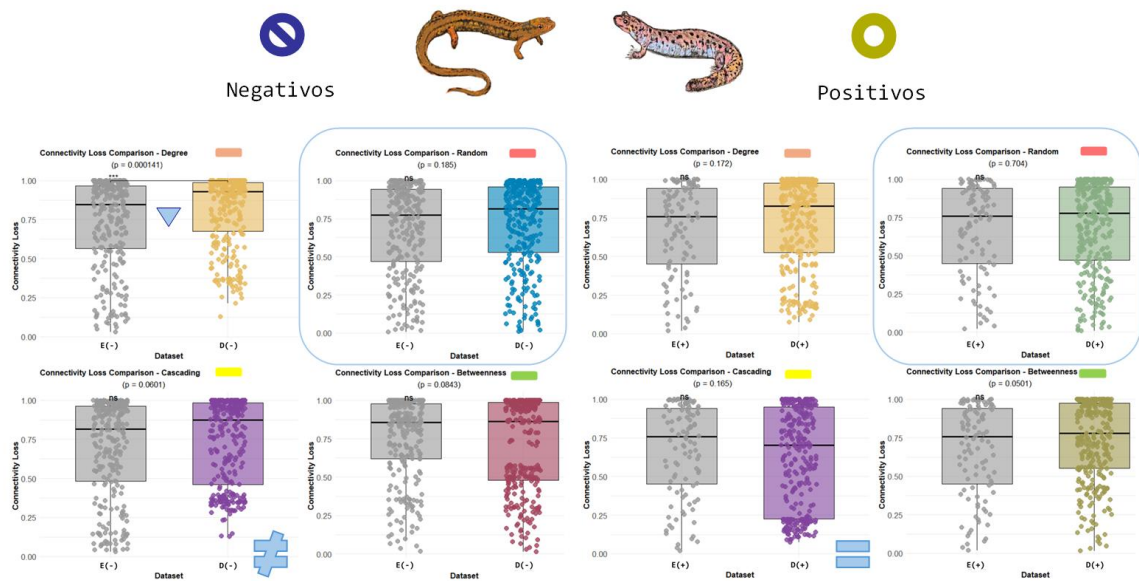


Figura 27. Comparativa del análisis de robustez de las redes entre especies tolerantes. Esta figura presenta la comparación estadística de cada uno de los métodos de remoción de nodos. En este caso se presenta el método cascada. Se realizó una prueba de ANOVA en una vía con prueba *post-hoc* Tukey. Las etiquetas señalan las iniciales del grupo de salamandras estudiadas *Eurycea* (E) y *Desmognathus* (D). Así mismo, la condición de los grupos está indicada por (+) para aquellos animales positivos en la detección de *Bd*, como (-) para

aquellos animales que no presentaron *Bd.* La significancia se presenta con (*, **** y ns) para comparaciones significativas y no significativas, respectivamente. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026a).

CAPITULO II.- La identificación de patógenos y la búsqueda de dianas terapéuticas

Este capítulo forma parte del artículo aceptado en International Journal of Microbiology:

Ramírez-Villarreal, J., & Álvarez-Martínez, R. (2026). Identification of Opportunistic Pathogens on the Skin of Salamanders for Use as Molecular Targets of a De Novo Design of Multitarget Anti- *Bd* Proteins. International Journal of Microbiology, 2026(1), 5903624. <https://doi.org/10.1155/ijm/5903624>.

Las enfermedades fúngicas en la fauna silvestre, como la quitridiomycosis en anfibios, causada por *Bd* y *Bsal*, han provocado la extinción de varias especies. La dificultad para tratarlas se debe en parte a las diferencias en la microbiota cutánea de los animales, que afectan a la eficacia de los tratamientos. Los estudios sugieren que la microbiota puede influir en las defensas inmunitarias y en la absorción y asimilación adecuadas de los fármacos, pero estas interacciones no se han investigado a fondo en anfibios. Para desarrollar tratamientos eficaces, es necesario tener en cuenta tanto el patógeno como la microbiota oportunista asociada al huésped, con el fin de ayudar a restablecer su equilibrio microbiológico. Este enfoque es fundamental, los anfibios desempeñan un papel ecológico clave en el control de los insectos vectores de enfermedades humanas. Este trabajo propone un tratamiento específico para reducir la proliferación de *Bd* y de microorganismos oportunistas en la piel, basado en estudios previos y en un enfoque bioinformático integral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de literatura

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed con el objetivo de identificar estudios enfocados en la caracterización de la microbiota cutánea de salamandras que, adicionalmente, incluyeran la detección del hongo patógeno *Bd* mediante técnicas moleculares estándar, como PCR convencional o PCR en tiempo real (qPCR).

Toda la bibliografía recuperada a partir de esta búsqueda fue compilada y considerada para su posible inclusión en el presente estudio. Como criterio fundamental, se requirió que los datos de secuenciación asociados a cada trabajo estuvieran correctamente registrados en repositorios públicos, con un identificador de BioProject, y respaldados por una publicación científica indizada. Este procedimiento permitió corroborar la consistencia y calidad de la información disponible en las bases de datos, así como complementar metadatos relevantes asociados a cada conjunto de secuencias, garantizando la trazabilidad y reproducibilidad de los análisis realizados.

Construcción de la base de datos

La construcción de la base de datos se llevó a cabo mediante la descarga de los archivos de secuenciación utilizando un script de Bash y la suite de herramientas SRA Toolkit (<https://github.com/nbci/sra-tools>). Todos los registros con identificadores SRR fueron descargados directamente desde el repositorio del NCBI y posteriormente convertidos a formato FASTQ dentro del mismo entorno de trabajo. Cada archivo generado fue organizado de manera sistemática en una estructura de carpetas que consideró la especie de salamandra, la localización geográfica del muestreo y la condición de salud del hospedero, clasificada como *Bd detectado* o *Bd no detectado*.

Los datos recopilados corresponden a al menos dos familias del orden Caudata: Salamandridae y Ambystomatidae. Dentro de estos grupos, se identificaron cuatro especies representadas en los conjuntos de secuencias analizados: *Ambystoma altamirani*,

Notophthalmus viridescens, *Desmognathus monticola* y *Eurycea bislineata*. Todas las muestras cutáneas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en dos localidades del estado de Virginia, Estados Unidos: Brightwood y Front Royal.

Los datos de secuenciación empleados provienen de dos proyectos públicos registrados en el NCBI. El primero corresponde al BioProject PRJNA819099, asociado al estudio de muestreo y secuenciación realizado por Martínez-Ugalde *et al.* (2022). El segundo corresponde al BioProject PRJNA659464, vinculado al trabajo de muestreo y secuenciación reportado por Mulet-Woltz *et al.* (2022). La utilización de estos conjuntos de datos permitió integrar información genómica validada y adecuadamente documentada, garantizando la trazabilidad y reproducibilidad de los análisis realizados en este estudio.

Identificación de patógenos

La identificación de microorganismos patógenos y oportunistas presentes en las muestras se realizó utilizando el servidor en línea 16sPIP, una herramienta automatizada diseñada para la detección de patógenos a partir de datos de secuenciación del gen 16S rRNA. Este servidor permite identificar la presencia de hasta 155 patógenos de relevancia clínica en humanos, proporcionando un marco estandarizado para la detección y clasificación de microorganismos potencialmente patogénicos (Miao *et al.*, 2017).

Los archivos en formato FASTQ obtenidos a partir de la descarga de los datos de secuenciación fueron utilizados directamente como archivos de entrada para el análisis en 16sPIP. Una vez completado el procesamiento, los resultados generados por el servidor fueron descargados en formato PDF. Posteriormente, la información contenida en estos reportes fue extraída y organizada en tablas de datos mediante hojas de cálculo, las cuales fueron convertidas al formato CSV para facilitar su manejo computacional.

A partir de estas tablas, se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia de patógenos, que fue utilizada como base para los análisis posteriores en el entorno estadístico R. Asimismo, con las listas de patógenos identificados se generaron diagramas de Venn, con el

objetivo de comparar la composición bacteriana patógena entre las distintas especies de salamandras analizadas y entre las condiciones de salud evaluadas (*Bd detectado* y *Bd no detectado*). Este enfoque permitió identificar patrones diferenciales en la presencia de patógenos asociados al estado de infección y a la identidad taxonómica del hospedero.

Selección e identificación de blancos moleculares

A partir de los resultados obtenidos mediante los diagramas de Venn y considerando las proporciones relativas, expresadas como el porcentaje de coincidencias de lecturas, asignadas a cada patógeno por el programa 16sPIP, se construyó una lista consolidada de bacterias patógenas comunes a las muestras provenientes de animales infectados por *Bd*. Este procedimiento permitió filtrar y priorizar aquellos microorganismos cuya presencia fue consistente y recurrente en los individuos con infección confirmada.

Con base en esta lista, se identificaron las bacterias que presentaron los valores más elevados de coincidencia de lecturas asociadas a patogenicidad. Dichos microorganismos fueron considerados como candidatos prioritarios a dianas moleculares, bajo el supuesto de que su presencia podría contribuir directa o indirectamente a la disbiosis cutánea y a la persistencia de *Bd*. Esta estrategia permitió enfocar el diseño del tratamiento propuesto en blancos moleculares específicos, reduciendo la complejidad del sistema y maximizando la relevancia biológica de las interacciones consideradas.

Parámetros que considerar para el diseño y su blanco molecular

La selección del blanco molecular y el diseño de la proteína terapéutica se fundamentaron en una serie de criterios estructurales y funcionales cuidadosamente definidos. En primer lugar, se priorizaron proteínas de membrana registradas en bases de datos públicas como el NCBI, cuya función biológica fuera esencial para la viabilidad celular y que presentaran un alto número de copias por célula, con el fin de maximizar la probabilidad de interacción efectiva con el tratamiento diseñado.

Asimismo, se estableció como requisito que dichas proteínas estuvieran localizadas en la membrana plasmática y que contaran con secuencias completas o, en su defecto, con una longitud mínima de 390 aminoácidos. Este umbral permitió asegurar la factibilidad de realizar predicciones estructurales completas y confiables del receptor, condición necesaria para los análisis de modelado y acoplamiento molecular posteriores.

Una vez identificado el blanco molecular que cumplía con estos criterios, su secuencia fue descargada en formato FASTA o, alternativamente, copiada y almacenada en un archivo de texto (.txt), con el propósito de facilitar su integración en las herramientas de predicción estructural y análisis computacional empleadas en las etapas subsecuentes del estudio.

Revisión de herramientas

Para determinar qué herramientas resultaban más adecuadas para cada etapa del proceso, se llevó a cabo un análisis detallado de las características técnicas y metodológicas de los programas y plataformas identificados durante la revisión bibliográfica. Este análisis incluyó la evaluación de aspectos como los requerimientos computacionales, los tiempos de respuesta, la calidad y confiabilidad de los resultados reportados, los formatos de archivo requeridos como entrada (*input*) y generados como salida (*output*), así como el fundamento metodológico de cada herramienta.

Con base en estos criterios, se seleccionaron aquellas herramientas que ofrecían un equilibrio óptimo entre desempeño computacional, robustez metodológica y aplicabilidad al objetivo del estudio. Las herramientas seleccionadas se organizaron en categorías funcionales, incluyendo:

(i) Servidores en línea que no requieren instalación local y presentan tiempos de respuesta aproximados de hasta 72 horas; (ii) Servidores de modelado estructural basados en enfoques con plantilla (*template-based*) y sin plantilla (*template-free*); y (iii) Programas de post-modelado, orientados a la visualización, validación estructural y análisis de proteínas.

Compilación de programas para análisis de proteínas

Para el análisis de las secuencias proteicas diseñadas se realizó una búsqueda sistemática de herramientas computacionales mediante PubMed y Google Scholar. Como criterios de inclusión, se consideraron únicamente aquellas herramientas respaldadas por publicaciones científicas revisadas por pares en los últimos cinco años y cuyos servidores o programas se encontrarán disponibles y operativos para su uso en el año 2025.

La selección se centró en herramientas capaces de evaluar aspectos funcionales y estructurales relevantes para el diseño racional de proteínas con potencial terapéutico. Entre los parámetros considerados se incluyeron la calidad estructural del modelo, la estabilidad y vida media de la proteína, la predicción de actividad antifúngica, la identificación de motivos estructurales o regiones específicas de la secuencia de aminoácidos asociadas a funciones de unión a membrana, así como predictores de disrupción en la formación de biofilms, entre otros atributos funcionales de interés. Esta compilación permitió conformar un conjunto de herramientas complementarias para la evaluación integral de las proteínas diseñadas en las distintas etapas del análisis.

Selección de aminoácidos

Cada aminoácido posee propiedades fisicoquímicas específicas determinadas por la composición atómica y los enlaces que conforman su cadena lateral, las cuales influyen de manera directa en la conformación, estabilidad y función de las proteínas. En el diseño de la proteína terapéutica propuesta se realizó una selección dirigida de aminoácidos con base en estas propiedades, priorizando aquellos capaces de conferir flexibilidad estructural, así como aminoácidos conocidos por su contribución a la estabilidad y al mantenimiento de la estructura tridimensional, como las cisteínas, debido a su capacidad para formar enlaces disulfuro.

Asimismo, se identificaron aminoácidos y motivos cortos de la secuencia, incluidos tripletes con actividad antimicrobiana previamente reportada, mediante la revisión de literatura

especializada en química y bioquímica, así como artículos científicos enfocados en el diseño y caracterización de péptidos antimicrobianos. Esta estrategia permitió integrar consideraciones estructurales y funcionales en la selección de los aminoácidos, con el objetivo de maximizar el potencial terapéutico de la proteína diseñada.

RESULTADOS

A partir de la base de datos de secuencias recopiladas para el análisis de la microbiota cutánea, se seleccionaron exclusivamente aquellas correspondientes a anfibios con infección por *Bd* confirmada mediante PCR, con el objetivo de identificar microorganismos potencialmente relevantes para el desarrollo de una estrategia terapéutica. Los individuos analizados pertenecen a los siguientes géneros y especies, junto con el número de muestras procesadas en cada caso: *D. monticola* (cinco muestras), *N. viridescens* (doce muestras), *E. bislineata* (dos muestras) y *A. altamirani* (veintinueve muestras).

Las secuencias crudas obtenidas a partir de las muestras de piel fueron procesadas utilizando el servidor **16sPIP**, el cual permite la identificación de microorganismos patógenos y oportunistas a partir de archivos FASTQ. Para cada muestra, el análisis produjo una lista de microorganismos detectados, evidenciando variaciones tanto en el número como en la identidad taxonómica de los patógenos entre individuos, incluso dentro de una misma especie.

En el caso de *A. altamirani*, la comparación de todas las muestras analizadas reveló la presencia de un conjunto de doce bacterias patógenas compartidas entre los individuos de esta especie. Dichas bacterias fueron: *Yersinia pestis*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas punctata* y *Yersinia enterocolitica*. Este conjunto común sugiere la existencia de un núcleo patogénico asociado a individuos infectados por *Bd* dentro de esta especie (Ver Figura 28 y Suplementaria 1).

No obstante, también se observaron diferencias específicas entre muestras individuales de *A. altamirani*. Por ejemplo, en una de las muestras se detectaron seis microorganismos con presencia diferencial: *Brucella ovis*, *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium bovis*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter mori* y *Streptococcus vestibularis*. En otras muestras, la composición patogénica fue más reducida, identificando únicamente *Proteus vulgaris* y *Prevotella intermedia*. En algunos casos se detectó exclusivamente *Streptococcus oralis*, mientras que en otra muestra se identificó un conjunto distinto de bacterias, incluyendo *Shigella flexneri*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella ruminicola*, *Citrobacter freundii*, *Shigella boydii* y *Prevotella melaninogenica*.

Estos resultados ponen de manifiesto una elevada heterogeneidad en la composición de microorganismos patógenos asociados a la microbiota cutánea de individuos infectados, incluso dentro de una misma especie. Esta variabilidad respalda la hipótesis de que la disbiosis microbiana asociada a la infección por *Bd* no responde a un único patrón taxonómico, sino a configuraciones múltiples que podrían influir diferencialmente en la progresión y severidad de la enfermedad.

La comparación de los perfiles patogénicos obtenidos a partir de las muestras de *D. monticola* permitió identificar un total de 27 bacterias patógenas compartidas entre todos los individuos analizados de esta especie. Entre los microorganismos detectados de manera consistente se encontraron *Brucella canis*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus anthracis*, *Enterobacter hormaechei*, *Afipia massiliensis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Enterococcus faecium*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter asburiae*, *Yersinia pestis*, *Enterobacter kobei*, *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Afipia broomeae*, *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brucella ovis* y *Enterobacter soli*.

Además del núcleo común de patógenos, se observaron bacterias diferenciales específicas para cada muestra. En la muestra 1 se identificaron especies principalmente del género *Streptococcus*, incluyendo *S. oralis*, *S. mitis*, *S. peroris*, *S. entericus*, *S. australis* y *S.*

pseudoporcinus, así como *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella pneumotropica* y *Bordetella bronchiseptica*. En la muestra 2 se detectaron microorganismos como *Afipia felis*, *Prevotella copri*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia massiliae*, *Streptococcus parasanguinis* y varias especies del género *Mycobacterium*. En las muestras 3, 4 y 5 se identificaron únicamente dos bacterias diferenciales por muestra, incluyendo *Clostridium difficile*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Amycolata autotrophica*, *Actinomyces israelii* y *Actinomyces gerencseriae*, respectivamente (Ver Figura 28 y Suplementaria 1).

Para el género *Eurycea*, el análisis reveló un total de 29 bacterias patógenas compartidas entre todas las muestras analizadas. Entre las especies identificadas se encontraron *Brucella canis*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia pestis*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Enterobacter hormaechei*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Brucella neotomae*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus faecium*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus equinus*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas punctata*, *Brucella ovis*, *Enterobacter asburiae*, *Streptococcus suis* y *Yersinia enterocolitica*.

En el caso del género *Notophthalmus*, se identificaron 21 bacterias patógenas compartidas entre todas las muestras analizadas. Estas incluyeron *Brucella canis*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus anthracis*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecium*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas punctata*, *Enterobacter asburiae*, *Yersinia pestis*, *Enterobacter kobei*, *Streptococcus parauberis*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter ludwigii* y *Klebsiella pneumoniae*. De manera similar a las otras especies, se observaron diferencias cuantitativas entre muestras individuales, con variaciones que oscilaron entre tres y once bacterias patógenas detectadas por muestra (véase lista completa en Anexos).

Finalmente, al comparar las muestras entre todas las especies de salamandras analizadas, se identificó un conjunto de 13 bacterias patógenas compartidas de manera consistente en todos los hospedadores. Este núcleo común estuvo conformado por *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Afipia broomeae*, *Acinetobacter lwoffii* y *Klebsiella pneumoniae*.

Un subconjunto de estas bacterias comunes fue seleccionado como base para el diseño del tratamiento propuesto, priorizando aquellas con alta recurrencia y relevancia funcional, como *Edwardsiella tarda*, *Yersinia pestis*, *Acinetobacter baumannii* y *Vibrio fluvialis* (véase Tabla 1 en Anexos y Figura 28).

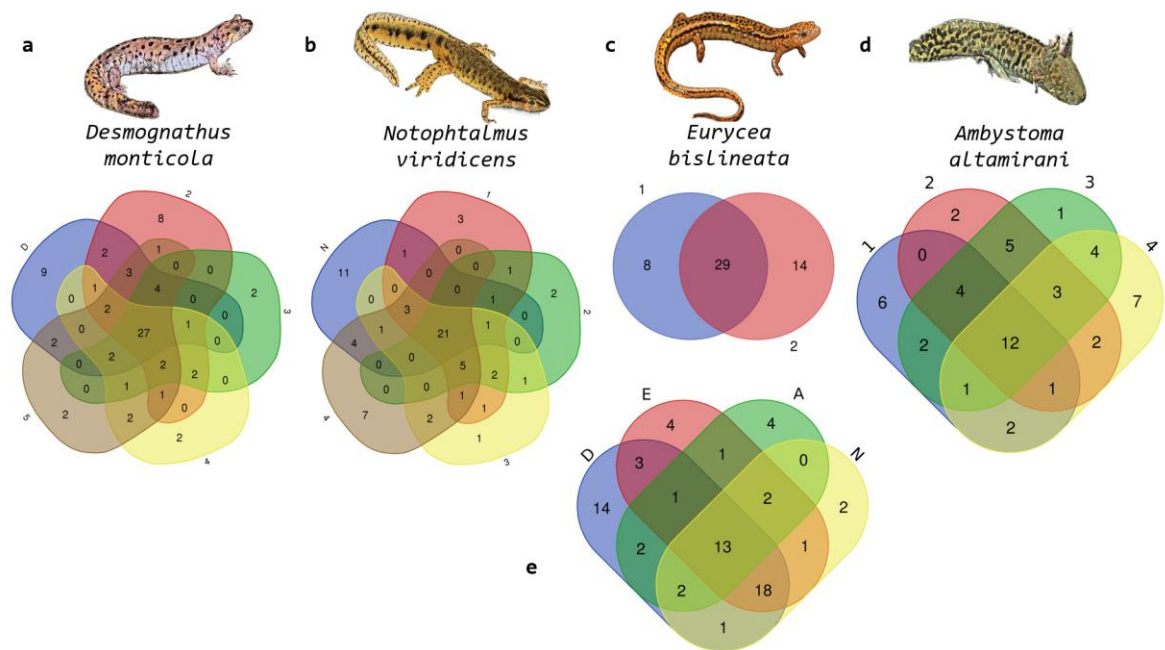


Figura 28. Diferencias en la composición de microorganismos potencialmente patógenos por grupos. Se muestra el diagrama de Venn para cada especie de salamandra. A) pertenece a los resultados del número de microorganismos compartidos e individuales

para cada una de las muestras de *D. monticola* (en total, 5 animales). B) Muestra las diferencias en la composición microbiana de las muestras en *N. viridescens* (5 animales muestreados en total). C) en *E. bislineata* (total 2 animales muestreados). D) Diferencias en *A. altamirani* (total de animales muestreados: 4). Y e) muestra la comparación entre cada especie de animal D (*Desmognathus*), E (*Eurycea*), A (*Ambystoma*) y N (*Notophthalmus*). **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026b.

Los resultados derivados del análisis mediante diagramas de Venn indicaron la presencia de un conjunto reducido de microorganismos compartidos entre las cuatro especies de salamandras analizadas. Con base en esta información, se procedió a la búsqueda de proteínas de membrana que cumplieran con los criterios previamente establecidos para su consideración como blancos moleculares. En todos los casos se seleccionó una proteína perteneciente a la superfamilia *Major Facilitator Superfamily* (MFS), debido a su relevancia funcional y a su presencia consistente en los microorganismos identificados (Ver Figura 29 y 30).

Las proteínas de la superfamilia MFS constituyen una de las dos grandes familias de transportadores transmembrana y participan en el transporte de una amplia variedad de sustratos, incluyendo azúcares, inosítoles, oligosacáridos, aminoácidos, fármacos y otros metabolitos, así como en el transporte de cationes. Estas funciones las convierten en componentes clave del metabolismo y la viabilidad celular, lo que las posiciona como blancos moleculares atractivos para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas (Pao *et al.*, 1998).

Para evaluar la similitud estructural y funcional entre las proteínas MFS seleccionadas, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa MUSCLE, con el objetivo de identificar regiones conservadas potencialmente funcionales que pudieran ser aprovechadas para dirigir el diseño del tratamiento. De manera complementaria, se llevó a cabo un análisis BLASTp de las secuencias MFS con el fin de determinar su distribución en otros

microorganismos y evaluar el grado de especificidad del blanco seleccionado (Ver Figura 29).

Los resultados de estos análisis indicaron que únicamente cuatro especies bacterianas presentaron homología significativa en las secuencias de las proteínas MFS entre las salamandras estudiadas: *Vibrio fluvialis*, *Acinetobacter baumannii*, *Yersinia pestis* y *Edwardsiella tarda*. Estas especies correspondieron, además, a aquellas con los porcentajes más altos de lecturas identificadas en las muestras analizadas, lo que refuerza su relevancia como componentes recurrentes del núcleo patogénico asociado a los individuos infectados. Las listas completas de microorganismos identificados por muestra se encuentran disponibles en la sección de Anexos.

Finalmente, se realizó una revisión dirigida de la literatura científica mediante búsquedas específicas en PubMed para cada uno de estos patógenos, con el fin de contextualizar sus características biológicas y su asociación con distintos cuadros clínicos. Esta revisión reveló que se trata de especies poco frecuentes en ambientes naturales o acuáticos no perturbados, pero con una capacidad bien documentada para causar infecciones de alta gravedad en humanos, lo que subraya su potencial impacto ecológico y sanitario y respalda su selección como blancos moleculares prioritarios en este estudio.

El diseño del tratamiento se llevó a cabo mediante una estrategia modular basada en bloques de secuencias, de tal forma que cada segmento cumpliera una función específica dentro del mecanismo de acción propuesto. Esta aproximación permitió orientar el tratamiento no solo contra las bacterias patógenas oportunistas presentes en la microbiota cutánea, sino también de manera directa contra el patógeno fúngico *Bd*. Para ello, se definieron tres niveles jerárquicos de dianas moleculares en las bacterias patógenas identificadas:

(i) la interacción con la barrera de la pared celular, (ii) la unión e inserción en la membrana plasmática, asumida con una carga neta negativa, y (iii) la interacción específica con una proteína funcional localizada en la membrana.

Con base en esta estrategia, se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos del NCBI, dentro de la sección de proteínas y estructuras, para cada uno de los géneros y especies bacterianas identificadas como relevantes. El objetivo fue localizar proteínas con funciones esenciales y conservadas que pudieran servir como blancos moleculares. En aquellos casos en los que existían estructuras cristalográficas disponibles, estas podrían haberse utilizado directamente mediante la descarga de archivos PDB. Sin embargo, para ninguno de los microorganismos seleccionados como diana se encontraron proteínas de membrana con estructuras cristalográficas reportadas, lo que hizo necesario recurrir a la obtención de las secuencias primarias desde la sección de proteínas del NCBI.

Las secuencias obtenidas en formato FASTA se utilizaron como entrada para la generación de modelos estructurales tridimensionales mediante el programa trRosetta, el cual permite una predicción robusta del plegamiento proteico en ausencia de plantillas experimentales. A partir de estos modelos, se identificó un blanco molecular común en todas las especies bacterianas analizadas: una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia *Major Facilitator Superfamily* (MFS).

Para evaluar el grado de conservación de esta proteína entre las distintas especies, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias MFS correspondientes. El análisis se centró en la búsqueda de regiones conservadas, particularmente en los dominios transmembrana, con el objetivo de identificar segmentos que pudieran ser funcionalmente críticos y susceptibles de ser reconocidos por una única secuencia diseñada. No obstante, los resultados mostraron que no existían homologías suficientemente conservadas en estas regiones que permitieran el diseño de una secuencia complementaria universal para todos los casos (Ver Figura 29).

Ante esta limitación, se adoptó una estrategia alternativa basada en el análisis detallado de los aminoácidos expuestos en las regiones extracelulares de cada proteína MFS. Estas regiones presentan una mayor variabilidad interespecífica, pero también ofrecen accesibilidad directa para interacciones proteína–proteína. A partir de este análisis, se definieron segmentos específicos de cada receptor que permitieran diseñar bloques de secuencia con afinidad basada en complementariedad fisicoquímica, más que en identidad

estricta de secuencia, optimizando así la probabilidad de interacción efectiva entre el tratamiento diseñado y cada uno de los blancos moleculares.

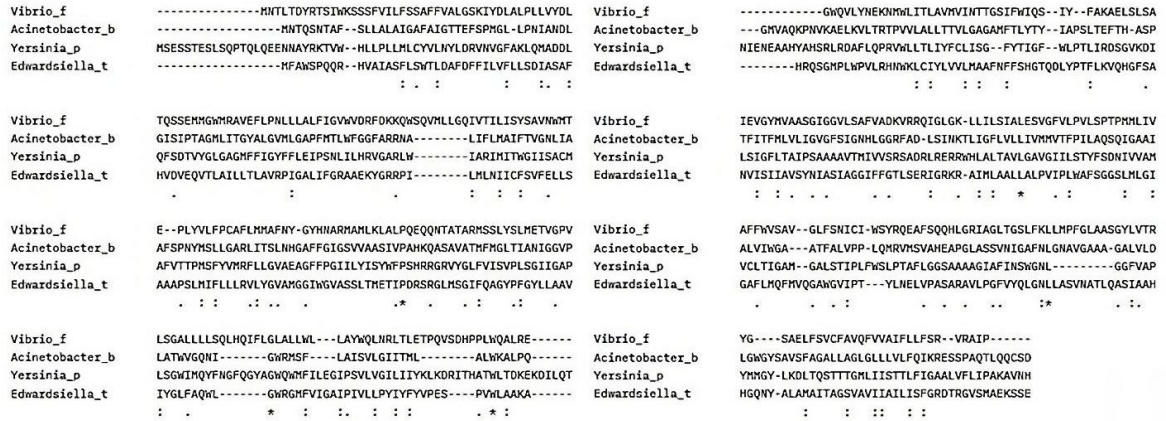


Figura 29. Alineamiento múltiple. Se muestran los resultados del alineamiento realizado para la proteína transmembrana MSF de los cuatro microorganismos diana del tratamiento a diseñar. Se observan regiones altamente conservadas (*), moderadamente conservadas (:), y ninguna conservación significativa (.). Las cuatro proteínas tienen secuencias conservadas que podrían representar funciones importantes en todas las especies. Estas áreas pueden ser utilizadas como potenciales dianas para el tratamiento, buscando su localización en las áreas extracelulares de la proteína. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Se priorizó la identificación de proteínas diana con estructuras cristalográficas disponibles; sin embargo, en todos los casos analizados únicamente se contó con la información correspondiente a las secuencias primarias. Con el objetivo de inferir la conformación tridimensional de estas proteínas, se empleó el programa trRosetta para la predicción estructural *de novo*. Únicamente se seleccionaron aquellos modelos que alcanzaron valores de calidad elevados, definidos por una puntuación $TM \geq 0.5$, criterio que garantiza una predicción estructural confiable y consistente entre modelos (Ver Figura 30).

Las secuencias correspondientes a los transportadores de la *Major Facilitator Superfamily* (MFS) fueron analizadas adicionalmente mediante **SWISS-MODEL**, con el propósito de

predecir su orientación y topología en la membrana plasmática. Este análisis permitió identificar con mayor precisión las regiones transmembrana, extracelulares y asociadas al poro del transportador.

Posteriormente, los modelos estructurales obtenidos se analizaron detalladamente utilizando PyMOL, enfocándose en la caracterización de las regiones extracelulares y del canal de transporte. A partir de este análisis se extrajeron las secuencias correspondientes a dominios expuestos al medio extracelular, así como aquellos residuos con propiedades fisicoquímicas potencialmente relevantes para la interacción con otras moléculas. En particular, se identificaron aminoácidos aromáticos como triptófano (W) y tirosina (Y), así como cisteínas (C) con capacidad de formar puentes disulfuro, los cuales pueden contribuir a la estabilidad estructural e interacciones específicas proteína–proteína (Ver Figura 30).

Asimismo, se consideraron aminoácidos con propiedades anfipáticas, hidrofílicas o hidrofóbicas —tales como alanina (A), glicina (G), leucina (L), isoleucina (I), treonina (T) y metionina (M)— debido a su papel en la interacción con membranas biológicas y en la formación de interfaces de unión. De manera complementaria, se dio especial énfasis al uso de secuencias enriquecidas en arginina (R) y triptófano (W), aminoácidos ampliamente documentados en la literatura por su participación en mecanismos antimicrobianos y antifúngicos, particularmente en péptidos capaces de insertarse en membranas celulares (Clark *et al.*, 2021).

Finalmente, los modelos estructurales generados mediante trRosetta fueron comparados con las predicciones disponibles en AlphaFold, observándose una alta concordancia entre ambas aproximaciones. No se detectaron diferencias estructurales relevantes que comprometieran la interpretación de los resultados, lo que respalda la robustez de los modelos utilizados para el análisis estructural y el posterior diseño del tratamiento.

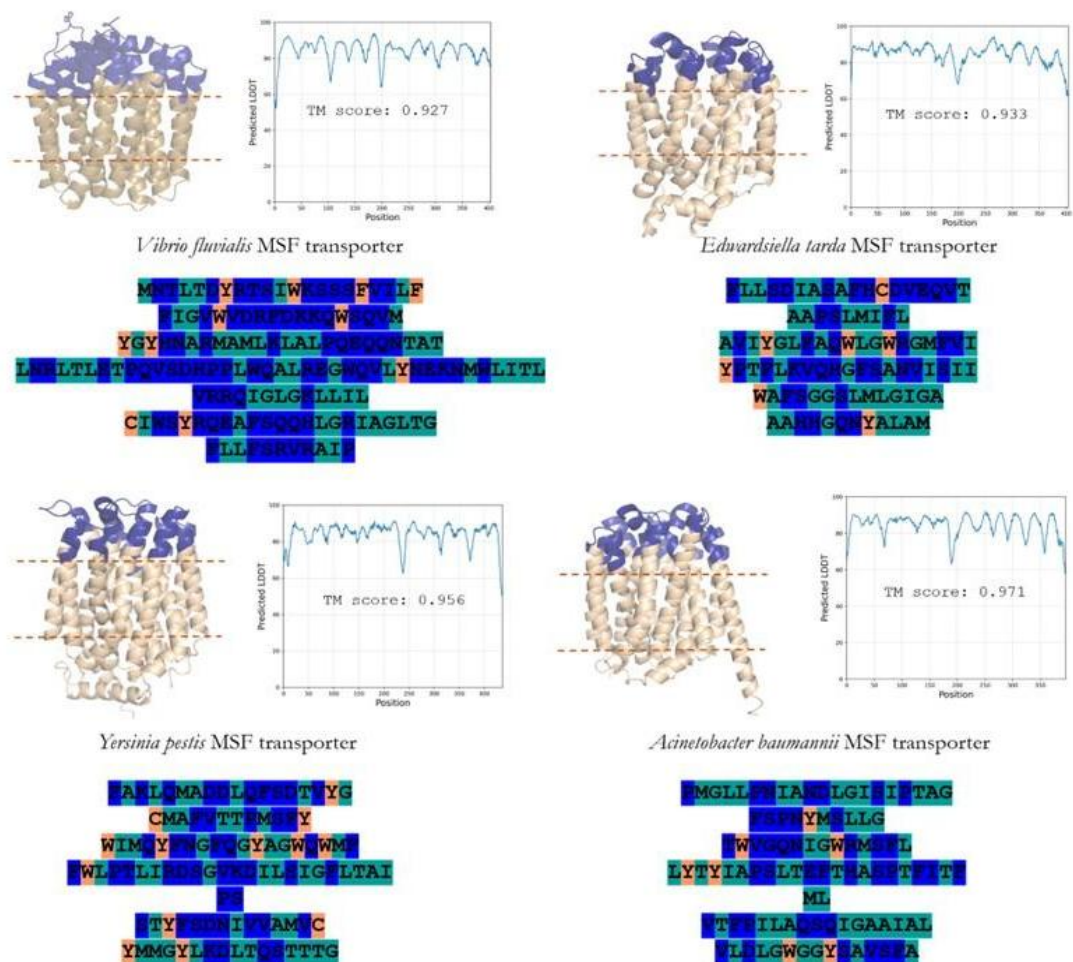


Figura 30. 3D modelos de las dianas moleculares (en bacterias patógenas identificadas).

Se muestran los resultados obtenidos de la modelización tridimensional mediante minimización energética de la proteína transmembrana MSF presente en los cuatro microorganismos patógenos diana. La figura de la proteína se muestra en color beige, en azul las regiones ubicadas en el lado extracelular, con líneas punteadas rojas que muestran la delimitación de la membrana plasmática. En la parte derecha de cada modelo podemos ver los resultados de la puntuación TM, los valores deben ser $>0,5$ y la predicción LDDT es la calidad de plegamiento de cada aminoácido en el modelo, los valores por encima del 60% son ideales. En el reverso de cada modelo y sus resultados de plegamiento, encontramos la secuencia de la región azul, donde podemos observar aminoácidos en verde como carga

complementaria, hidrofobicidad, anfipática, hidrófila que podrían tener unión con otros aminoácidos. En la naranja, aquellos aminoácidos aromáticos que pueden interactuar con aminoácidos como las cisteínas o con residuos de SH. Y en azul el resto de la secuencia.

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

La selección del blanco molecular en el hongo *Bd* constituyó una etapa fundamental del proceso de diseño. El blanco elegido debía cumplir con una serie de criterios estrictos, entre los que se incluyeron la disponibilidad de información estructural confiable, como datos cristalográficos, modelos predichos mediante AlphaFold2, estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB) del NCBI o resultados consistentes de plegamiento obtenidos a partir de distintos predictores estructurales (Ver Tabla 1).

Adicionalmente, la secuencia de la proteína receptora fue analizada mediante alineamientos múltiples con el fin de evaluar su grado de conservación en otras especies de hongos o bacterias. El objetivo de este análisis fue identificar un blanco con el menor número posible de homólogos en otros organismos, y cuya función estuviera claramente caracterizada en la literatura, reduciendo así el riesgo de interacciones inespecíficas (Ver Tabla 1).

Los resultados del alineamiento múltiple indicaron la presencia de únicamente cinco proteínas con similitud detectable; sin embargo, estas presentaron porcentajes de identidad inferiores al 40 %. Asimismo, las regiones expuestas de dichas proteínas no mostraron conservación de aminoácidos clave, lo que sugiere una baja probabilidad de unión inespecífica entre la proteína diseñada y receptores homólogos en otras especies (ver Tabla 5). Estos resultados respaldan la especificidad del blanco molecular seleccionado y refuerzan su idoneidad para el desarrollo de una estrategia terapéutica dirigida (Ver Figura 31).

Tabla 1. Búsqueda de secuencias homólogas. El cuadro muestra los resultados de la búsqueda de blancos moleculares homólogos al receptor en *Bd*.

Descripción	Max score	Total score	Query cover	Ident.	ID
Plasma membrane alkali metal cation/H+ antiporter Sod22 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	316	316	69%	37.06%	NP_594194.1
Nha1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	317	317	70%	38.07%	NP_013239.1
Sodium proton antiporter [<i>Synechocystis</i>]	58.2	58.2	47%	24.65%	WP_194018922.1
Sodium proton antiporter [<i>Pseudomonas</i>]	51.2	51.2	43%	28.73%	WP_003113638.1
Sodium proton antiporter [<i>Deinococcus radiodurans</i>]	43.5	43.5	17%	28.95%	WP_231885354.1

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

En cuanto al modelaje estructural de este blanco molecular, podemos encontrar que se obtuvo un valor de TM-score de 0.776, que sobre pasa el valor promedio de 0.5, para considerarse como una buena aproximación estructural a lo que podría ser en la naturaleza este tipo de proteínas antiportadores. El número de aminoácidos que fue incluido en la modelización estructural por minimización energética es aproximadamente mayor a 500 aminoácidos. Se utilizaron como base para el diseño de la proteína tratamiento, a todos los aminoácidos que estuvieran expuestos en dicho canal iónico. Esta selección posteriormente fue validada utilizando el programa CASTpFold, para todos los receptores que fueron seleccionados como dianas moleculares del tratamiento (Ver Figura 31).

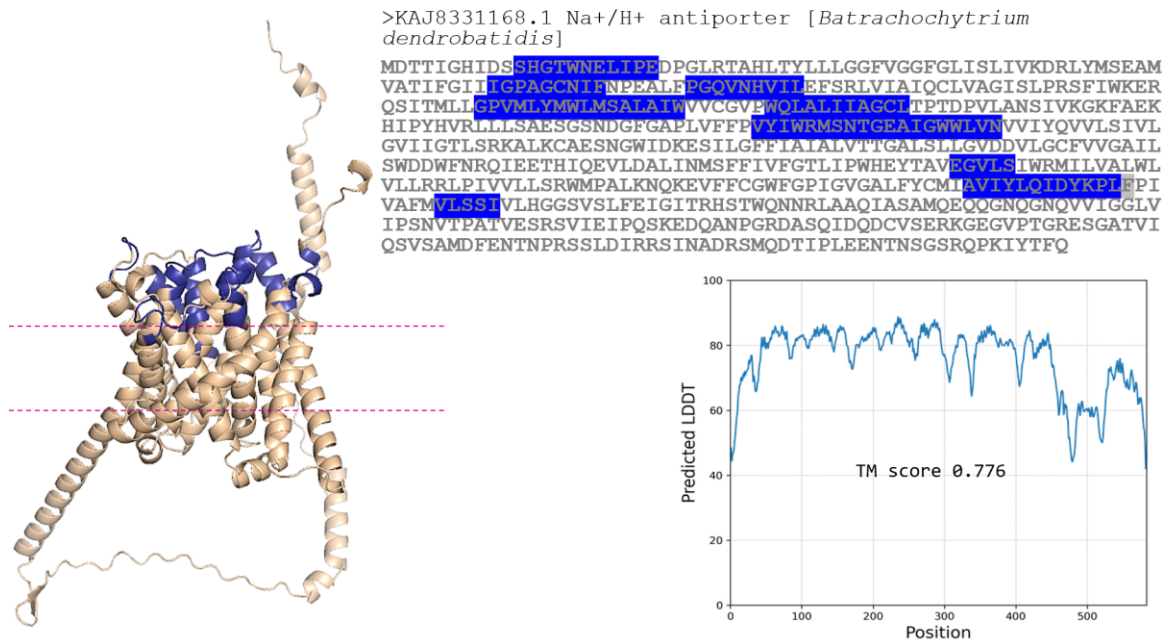


Figura 31. 3D modelos de las dianas moleculares (en el hongo *Bd*). Se muestran los resultados obtenidos de la modelización tridimensional mediante minimización energética de la proteína antiportadora de Na⁺/H⁺ en *B. dendrobatidis*. La figura de la proteína se muestra en color beige, en azul las regiones ubicadas en el lado extracelular, con líneas punteadas rojas que muestran la delimitación de la membrana plasmática. En la parte derecha de cada modelo podemos ver los resultados de la puntuación TM, los valores deben ser >0,5 y la predicción LDDT es la calidad de plegamiento de cada aminoácido en el modelo, los valores por encima del 60% son ideales. En el reverso de cada modelo y sus resultados de plegamiento, encontramos la secuencia de la región azul, donde podemos observar aminoácidos en verde como carga complementaria, hidrofobicidad, anfipática, hidrófila que podrían tener unión con otros aminoácidos.

CAPÍTULO III.- El diseño de proteínas terapéuticas, su modelaje estructural y su evaluación

Esta parte -capítulo- de la tesis está enfocada a describir cómo se desarrolló un método y las herramientas adecuadas para el diseño de una proteína con potencial para tratar a *Bd*. Este capítulo forma parte del artículo publicado:

Ramírez-Villarreal, J., & Álvarez-Martínez, R. (2025a). Application of I TASSER, trRosetta, UCSF Chimera, HADDOCK server, and HEX loria for *De Novo* and *In Silico* Design of Proteins. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 221. <https://doi.org/10.3791/68003>.

El diseño de proteínas consiste en construir secuencias de aminoácidos e incorporar motivos específicos para crear variantes funcionales. Este enfoque es fundamental para el desarrollo de péptidos antimicrobianos (AMP) destinados a combatir los patógenos resistentes a los antibióticos. Este artículo presenta un procedimiento para construir proteínas con diversas herramientas bioinformáticas. El diseño de proteínas consiste en construir secuencias de aminoácidos e incorporar motivos específicos, como sitios de unión, en receptores, canales iónicos u otras proteínas. Este enfoque permite producir variantes de proteínas con funciones y propósitos específicos. Un ejemplo de aplicación de estos recursos bioinformáticos es la mejora de los péptidos antimicrobianos (AMP) o el diseño de AMP sintéticos. Este desarrollo es significativo debido al reciente aumento de enfermedades emergentes, a menudo causadas por patógenos difíciles de erradicar y resistentes a los antibióticos. Las consecuencias de esta tendencia incluyen la extinción de especies animales y la muerte de seres humanos. Por lo tanto, es esencial la síntesis rápida de nuevos AMP eficaces. Estos servidores y programas pueden facilitar el rápido desarrollo de vacunas, péptidos antimicrobianos o tratamientos eficaces contra estos patógenos. El objetivo de este trabajo es presentar y proponer un procedimiento para construir proteínas a partir de secuencias y esclarecer el proceso de utilización de diferentes herramientas para construir estas moléculas paso a paso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión de la literatura

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed y en el repositorio NCBI con el objetivo de identificar herramientas computacionales actuales para la determinación y predicción de la estructura de proteínas. Como criterio de inclusión, se consideraron únicamente aquellas herramientas respaldadas por publicaciones científicas revisadas por pares y, adicionalmente, evaluadas por autores independientes a sus desarrolladores mediante comparaciones cualitativas y/o cuantitativas (por ejemplo, benchmarks, estudios de desempeño o revisiones metodológicas). Asimismo, se priorizaron herramientas con fecha de lanzamiento no mayor a cinco años; en casos excepcionales, se incluyeron herramientas más antiguas siempre que contarán con actualizaciones sustantivas o mantenimiento activo documentado durante los últimos cinco años.

Construcción de la secuencia tratamiento

Para la construcción de la secuencia terapéutica se emplearon diversas herramientas gratuitas y bases de datos especializadas orientadas al diseño de secuencias con propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Entre ellas se incluyeron el Registry of Standard Biological Parts (**iGEM**), **CIBV** (Linker Database), **CAMP** y **DRAMP**, las cuales constituyen bases de datos curadas que reúnen secuencias naturales y sintéticas con actividad antimicrobiana y antifúngica reportada.

De manera complementaria, se revisó literatura especializada que documenta la relevancia funcional de determinados aminoácidos, como la arginina y el triptófano, los cuales se asocian frecuentemente con propiedades bactericidas y fungicidas debido a su carga positiva, hidrofobicidad y capacidad de interacción con membranas celulares (Clark *et al.*, 2021). Esta información fue integrada como criterio adicional en el diseño de las secuencias.

A partir de la combinación de estos enfoques, se generaron doce secuencias candidatas, construidas de manera controlada, pero sin restringir a una única plantilla preexistente. Cada

una de estas secuencias fue posteriormente sometida a modelado estructural *de novo* utilizando el programa **RosettaX-Single**, prescindiendo del uso de plantillas estructurales o de la búsqueda de secuencias homólogas, con el objetivo de evaluar su capacidad intrínseca de plegamiento y su viabilidad estructural como posibles candidatos terapéuticos.

Pruebas de selección para los diseños

Las secuencias diseñadas fueron sometidas a una serie de pruebas computacionales con el objetivo de evaluar de manera integral su potencial funcional y descartar candidatos con propiedades no deseables. En primer lugar, se utilizó el programa **CAMPr4** para predecir la actividad antimicrobiana de cada secuencia. Este algoritmo genera valores normalizados en un rango de 0 a 1; de acuerdo con las especificaciones del programa, las secuencias con puntuaciones superiores a 0.5 fueron consideradas como candidatas con potencial antimicrobiano y seleccionadas para análisis posteriores. En esta etapa se evaluó tanto el potencial de péptidos antimicrobianos sintéticos como su similitud funcional con péptidos antimicrobianos naturales.

Posteriormente, se empleó el programa **Antifp** para caracterizar las propiedades fisicoquímicas de cada secuencia, incluyendo hidropaticidad, hidrofobicidad, anfipaticidad, carga neta, punto isoeléctrico y peso molecular. Este mismo servidor fue utilizado para predecir la posible actividad antifúngica de los constructos, una característica central en el diseño de la proteína terapéutica propuesta.

Con el fin de evaluar funciones adicionales relevantes para la mitigación de infecciones, se utilizó **BIOFIN** para predecir la capacidad antibiofilm de las secuencias, considerando que la formación de biofilms puede contribuir a la persistencia de patógenos en la piel del hospedero. Asimismo, el servidor **HemoPI** fue empleado para descartar secuencias con potencial actividad hemolítica, una propiedad indeseable desde el punto de vista de seguridad biológica.

Adicionalmente, se utilizó **ProtParam** para estimar parámetros de estabilidad y vida media de los constructos en distintos modelos biológicos, incluyendo reticulocitos, levaduras y *Escherichia coli*, lo que permitió obtener una aproximación comparativa de la estabilidad de las secuencias en distintos contextos celulares. Finalmente, se realizó una evaluación de la calidad del plegamiento estructural mediante el programa **QMEANDisCo**. Sin embargo, este análisis no arrojó resultados concluyentes, debido a que el método se basa en el uso de plantillas estructurales y las proteínas diseñadas *de novo* no presentan similitud significativa con estructuras previamente registradas en bases de datos curadas o no curadas. Este resultado es consistente con la naturaleza novedosa de los diseños generados y no se consideró como un criterio de exclusión.

Diseño de las secuencias

El diseño de las secuencias proteicas se llevó a cabo mediante la generación sistemática de múltiples combinaciones de aminoácidos, integrando criterios estructurales, fisicoquímicos y funcionales. Para ello, se emplearon distintos enfoques de construcción de secuencias. En primer lugar, se utilizaron reglas y formulaciones previamente publicadas que describen características clave asociadas a la actividad antimicrobiana, tales como la proporción de residuos cargados positivamente, el balance entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas y la distribución espacial de cargas a lo largo de la secuencia.

Adicionalmente, se diseñaron secuencias de distinta longitud, carga neta y peso molecular, con el objetivo de explorar un espacio amplio de configuraciones y evaluar cómo estas variables influyen en la estabilidad estructural, la interacción con membranas y el potencial antimicrobiano. Cada secuencia generada fue sometida a una serie de filtros computacionales orientados a descartar candidatos con propiedades desfavorables, como baja estabilidad predicha, alta toxicidad potencial o ausencia de motivos funcionales de interés.

Cuando una secuencia no cumplía con los criterios establecidos, se aplicó un proceso iterativo de optimización mediante el uso de programas de sustitución sistemática de aminoácidos. En este procedimiento, cada residuo de la secuencia era reemplazado de manera

individual por otros aminoácidos, generando variantes puntuales que posteriormente fueron reevaluadas mediante los mismos filtros y herramientas de análisis. Este enfoque permitió identificar sustituciones específicas capaces de mejorar propiedades funcionales o estructurales sin comprometer la integridad global de la secuencia.

Este proceso iterativo de generación, filtrado y optimización permitió refinar progresivamente las secuencias candidatas, seleccionando aquellas con mayor probabilidad de resultar funcionales y adecuadas para su análisis estructural posterior y su eventual evaluación como componentes de una estrategia terapéutica dirigida contra la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Generación de modelos

La generación de los modelos estructurales se realizó empleando distintos servidores de predicción, seleccionados en función de las características de las secuencias utilizadas como entrada (*input*) y del objetivo específico de cada modelo. Para las secuencias diseñadas *de novo*, se utilizó el programa **I-TASSER**, el cual ha demostrado ser particularmente robusto para la predicción de estructuras tridimensionales en ausencia de plantillas estructurales cercanas. Este enfoque resulta especialmente adecuado para secuencias cortas y novedosas, como las correspondientes a la proteína terapéutica diseñada, que integra simulaciones de plegamiento *ab initio* con información estadística derivada de bases de datos estructurales, permitiendo obtener modelos con una calidad estructural aceptable incluso en escenarios sin homología detectable.

Por otro lado, para la generación de modelos correspondientes a los blancos moleculares, generalmente proteínas de mayor longitud y complejidad estructural, se empleó **trRosetta**, un método basado en aprendizaje profundo que infiere restricciones geométricas a partir de mapas de contacto y distancias inter-residuo. Este servidor ha mostrado un desempeño sobresaliente en la predicción de estructuras de proteínas largas y complejas, lo que lo convierte en una herramienta adecuada para modelar con mayor precisión las dianas moleculares involucradas en la interacción con la proteína diseñada.

Una vez obtenidos los modelos estructurales, estos fueron sometidos a procesos de visualización, inspección y análisis estructural mediante programas especializados como **UCSF Chimera** y **PyMOL**. Estas herramientas permitieron evaluar aspectos como la conformación global de los modelos, la presencia de motivos estructurales relevantes, la distribución de cargas superficiales, la accesibilidad de regiones funcionales y la coherencia estructural general. Asimismo, facilitaron la comparación entre distintos modelos y la preparación de estructuras para análisis posteriores, incluyendo estudios de interacción molecular y validación estructural.

RESULTADOS

Para el diseño del componente antifúngico de la proteína terapéutica, se tomó como referencia el marco teórico propuesto por Shai *et al.* (2002), quienes desarrollaron principios fisicoquímicos para el diseño racional de péptidos sintéticos con actividad antifúngica. A partir de dichas formulaciones, se generaron secuencias candidatas que incorporan las características asociadas a la interacción efectiva con membranas fúngicas. De manera complementaria, se utilizó la base de datos de **péptidos antimicrobianos APD3** como referencia comparativa para validar que las propiedades de las secuencias diseñadas fueran consistentes con aquellas descritas previamente para péptidos con actividad comprobada.

El diseño de las secuencias antifúngicas se apoyó en tres estrategias principales. En primer lugar, se exploró la potenciación de moléculas previamente descritas en la literatura mediante su integración en arquitecturas quiméricas, con el objetivo de amplificar su efecto antifúngico. En segundo lugar, se desarrollaron secuencias *de novo* considerando de manera explícita parámetros fisicoquímicos clave, tales como carga neta, hidrofobicidad, hidrofiliidad, punto isoeléctrico (pI), solubilidad, índice de hidropaticidad, anfipaticidad y propiedades estructurales de los aminoácidos. Finalmente, se emplearon fórmulas y bases de datos especializadas como guías adicionales para la generación de secuencias candidatas.

Con el fin de evaluar la capacidad de reconocimiento entre las secuencias diseñadas y sus posibles dianas moleculares, se realizó un análisis de acoplamiento molecular utilizando el programa **HEX**. Estos análisis permitieron explorar la compatibilidad estructural entre la proteína diseñada y las proteínas objetivo, proporcionando evidencia preliminar de la factibilidad de interacción a nivel molecular.

Adicionalmente, el diseño de la proteína se orientó no sólo a la inhibición de bacterias oportunistas específicas, sino también a la incorporación de propiedades antifúngicas, con el objetivo de desarrollar un tratamiento multi-blanco más completo y específico. En el caso de *Bd*, se identificaron proteínas de membrana como posibles dianas moleculares. Considerando que la membrana y la pared celular del hongo presentan una carga neta negativa, se diseñaron secuencias complementarias con propiedades electrostáticas compatibles, orientadas a favorecer la interacción con dichas estructuras. Estas secuencias cortas antifúngicas fueron posteriormente fusionadas a las secuencias candidatas que superaron los filtros iniciales de calidad y funcionalidad.

Tras el proceso de selección y evaluación de herramientas computacionales, se eligieron cuatro plataformas principales debido a su alto desempeño, tiempos de respuesta adecuados y capacidad para generar métricas robustas de calidad estructural. Estas herramientas permitieron evaluar de manera consistente el plegamiento, la estabilidad y la coherencia estructural de las secuencias generadas. A partir de esta evaluación integral, se procedió a identificar la combinación óptima de aminoácidos para la construcción final de la proteína terapéutica, cuyo diseño integra propiedades antifúngicas y antibacterianas de manera sinérgica.

Para la construcción de la proteína se emplearon diversos enfoques complementarios. En primer lugar, se incorporaron tripletes de aminoácidos previamente descritos en la literatura por su actividad antimicrobiana, así como residuos individuales reconocidos por su participación directa en mecanismos de interacción y disrupción microbiana. De manera integrada, se seleccionaron aminoácidos con funciones antimicrobianas respaldadas

experimentalmente, junto con aquellos que presentan propiedades bioquímicas favorables para el diseño estructural de proteínas funcionales.

Se diseñaron un total de doce secuencias candidatas de tratamiento, cada una estructurada de manera modular, de modo que cada bloque funcional cumpliera un propósito específico dentro del diseño global de la proteína. En particular, cada secuencia incorpora una o dos regiones funcionales orientadas a favorecer la interacción inicial con estructuras de superficie, tales como la pared celular y la membrana plasmática de los microorganismos diana. Estas regiones fueron diseñadas considerando propiedades fisicoquímicas compatibles con la unión electrostática y la inserción en membranas con carga neta negativa (Ver Figura 32 y 33).

Adicionalmente, cada constructo incluye una región diseñada para permitir la interacción directa con cavidades o dominios expuestos de receptores proteicos específicos, previamente identificados como blancos moleculares relevantes. Estas regiones fueron optimizadas para maximizar la complementariedad estructural y química con las zonas extracelulares de los receptores, favoreciendo una interacción selectiva y funcional.

Con el fin de garantizar la correcta organización tridimensional del constructo, así como su estabilidad conformacional, todas las secuencias incorporan segmentos intermedios con función de espaciadores (*linkers*). Estos espaciadores permiten separar adecuadamente los dominios funcionales, reduciendo interferencias estructurales entre ellos y favoreciendo un plegamiento eficiente de la proteína en su conjunto. Para este propósito, se emplearon secuencias cortas de espaciadores provenientes de la base de datos del Registry of Standard Biological Parts (iGEM), seleccionadas por su uso previo en diseños sintéticos y su compatibilidad con sistemas biológicos (Ver figura 32 y 33).

Este enfoque modular permitió integrar múltiples funciones dentro de un solo constructo proteico, optimizando simultáneamente la unión a superficies celulares, la interacción con receptores específicos y la estabilidad estructural del tratamiento propuesto.

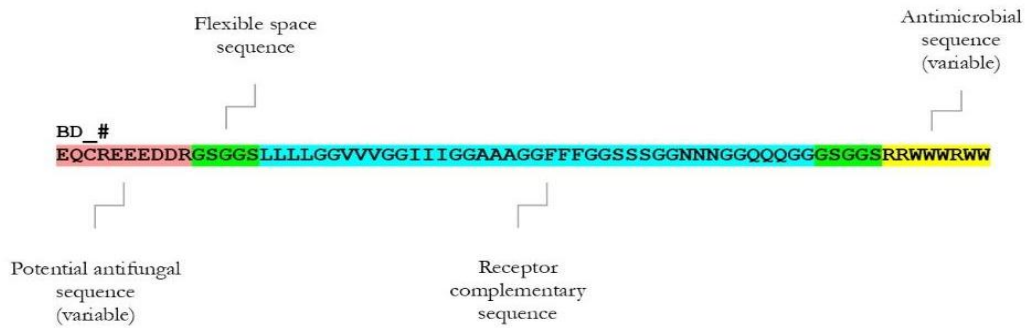


Figura 32. Diagrama de construcción del tratamiento. Muestra un ejemplo de cómo fue la construcción de la secuencia a partir de diferentes secciones como espaciadores flexibles en gris, secuencias modificadas con efectos antimicrobianos y antifúngicos probados de bases de datos en verde. La secuencia "complementaria" con las características químicas óptimas para la interacción con los aminoácidos estudiados de las regiones externas de la proteína transmembrana MSF se muestra en naranja. Además, se muestra en cian una breve secuencia *de novo* enriquecida con argininas y triptófanos, que se sabe que ayudan a la interacción con la membrana y tienen efectos antimicrobianos. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

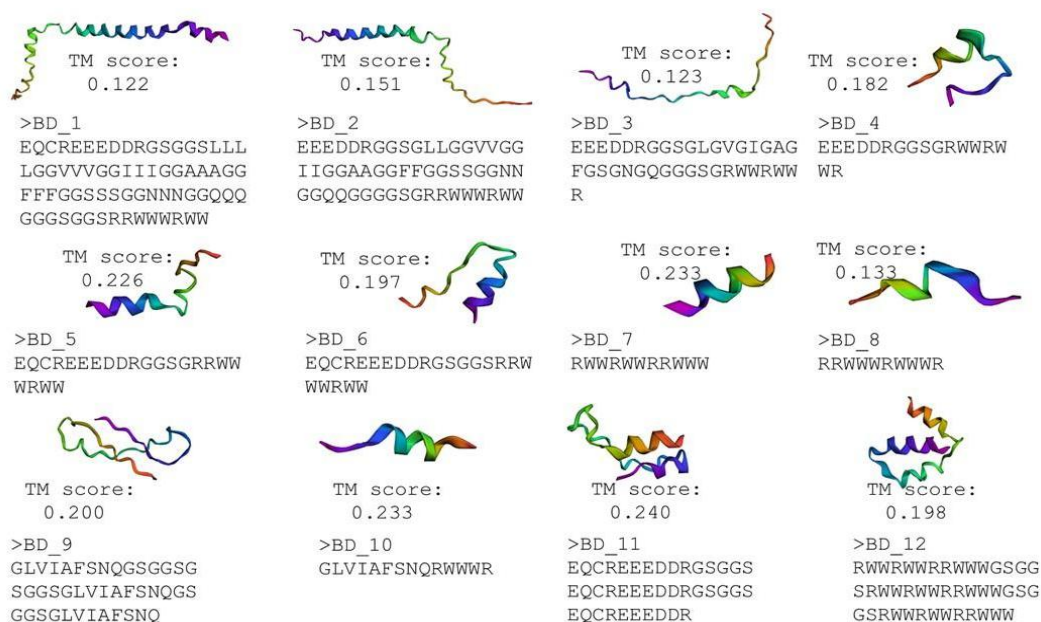


Figura 33. Generación de modelos estructurales. Se muestran los modelos generados a partir de las secuencias construidas. En total, se diseñaron y modelaron doce proteínas con diferentes longitudes de aminoácidos y con diferentes partes de secuencias con diferentes efectos previstos, espaciadores flexibles cortos o largos, aminoácidos bisagra, cadenas de aminoácidos con efectos antimicrobianos o antifúngicos modificados y secuencias aleatorias de triptófano y arginina. Se llevó a cabo una modelización para estudiar las características físicas y las posibles interacciones de estas proteínas con sus dianas moleculares. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Para determinar cuál de los constructos diseñados representaba la mejor opción como agente antimicrobiano, en función de su capacidad de interacción con las dianas moleculares seleccionadas, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular (*docking*) utilizando el programa HEX (loria). A partir de los análisis preliminares descritos anteriormente, se seleccionaron las seis secuencias con mejor desempeño global para someterlas a esta etapa de evaluación (Ver Figura 33).

Cada una de las estructuras proteicas diseñadas fue identificada con la nomenclatura BD_#, donde el número corresponde al identificador de la secuencia generada. Posteriormente, cada constructo BD_# fue evaluado frente a cada uno de los cuatro blancos moleculares seleccionados, con el objetivo de verificar su capacidad potencial de interacción en los distintos microorganismos diana y asegurar así un enfoque terapéutico multi-blanco.

El proceso de filtrado y selección de los mejores candidatos se basó en una evaluación integral que combinó múltiples criterios: los resultados de acoplamiento molecular obtenidos con HEX, así como los análisis de seguridad, estabilidad y funcionalidad derivados de los programas HemoPI, BIOFIN, Antifp, ProtParam y CAMPr4. Este enfoque permitió descartar secuencias con potencial citotóxico, baja estabilidad o funcionalidad limitada, priorizando aquellas con propiedades fisicoquímicas y biológicas más favorables (Ver Tabla 2).

Con el fin de validar que cada sección de las secuencias diseñadas cumpliera adecuadamente su función, tanto de manera individual como dentro del constructo completo, se llevaron a cabo análisis adicionales para determinar si las herramientas bioinformáticas disponibles clasificaban a las proteínas modificadas como potenciales agentes antimicrobianos y/o antifúngicos. Para ello, se empleó la base de datos CAMPr4, especializada en la identificación de secuencias como AMP (*antimicrobial peptide*) o NAMP (*non-antimicrobial peptide*).

CAMPr4 integra tanto AMPs naturales, aislados de organismos o secretados como parte de mecanismos defensivos, como AMPs sintéticos, desarrollados y optimizados en laboratorio. El algoritmo compara la secuencia de interés con este conjunto curado, evaluando similitudes en composición aminoacídica, patrones estructurales y propiedades fisicoquímicas asociadas a actividad antimicrobiana.

De las doce secuencias inicialmente diseñadas, únicamente seis fueron clasificadas como AMPs sintéticos, correspondientes a los constructos BD_3, BD_4, BD_7, BD_8, BD_10 y BD_12. En contraste, el análisis frente a AMPs naturales identificó nueve secuencias con similitud funcional, específicamente BD_1, BD_2, BD_3, BD_7, BD_8, BD_9, BD_10, BD_11 y BD_12 (ver Tabla 2).

Estos resultados permitieron reducir el conjunto de candidatos a aquellos constructos con mayor respaldo bioinformático en términos de actividad antimicrobiana potencial, sirviendo como base para las siguientes etapas de evaluación estructural y funcional.

Tabla 2. Características antimicrobianas de las secuencias diseñadas. En la siguiente tabla podemos observar los resultados del programa CAMPr4 que tiene la capacidad de predecir si una proteína tiene potencial función antimicrobiana (AMP) o no (NAMP) y también puede predecir esto para proteínas diseñadas (sintéticas) y secuencias de proteínas extraídas de la naturaleza (naturales). Cuenta con tres métodos de predicción diferentes que involucran diferentes bases de datos de predicción (_RF, _SVM y _ANN). Las probabilidades superiores a $\geq 0,5$ se consideran AMP (Gawde *et al.*, 2023).

ID	CAMPr4_RF (synthetic)		CAMPr4_SVM		CAMPr4_ANN		CAMPr4_RF (natural)		CAMPr4_SVM		CAMPr4_ANN	
	CLASS	AMP PROB	CLASS	AMP PROB	CLASS	AMP PROB	CLASS	AMP PROB	CLASS	AMP PROB	CLASS	AMP PROB
BD_1	NAMP	0.41	NAMP	0.39	NAMP	0.17	AMP	0.74	AMP	0.97	AMP	0.81
BD_2	NAMP	0.47	AMP	0.69	NAMP	0.38	AMP	0.71	AMP	0.99	AMP	0.85
BD_3	AMP	0.66	AMP	0.68	NAMP	0.4	AMP	0.61	AMP	0.96	NAMP	0.35
BD_4	AMP	0.55	AMP	0.7	NAMP	0.42	NAMP	0.44	AMP	0.63	NAMP	0.06
BD_5	NAMP	0.46	NAMP	0.44	NAMP	0.15	NAMP	0.48	AMP	0.53	NAMP	0.06
BD_6	NAMP	0.48	NAMP	0.35	NAMP	0.12	NAMP	0.46	AMP	0.53	NAMP	0.06
BD_7	AMP	0.99	AMP	0.98	AMP	0.99	AMP	0.77	AMP	1	NAMP	0.15
BD_8	AMP	0.98	AMP	0.97	AMP	0.99	AMP	0.66	AMP	0.99	NAMP	0.18
BD_9	NAMP	0.27	NAMP	0.15	NAMP	0.21	AMP	0.78	AMP	0.95	AMP	0.84
BD_10	AMP	0.89	AMP	0.99	AMP	0.97	AMP	0.84	AMP	0.56	AMP	0.88
BD_11	NAMP	0.14	NAMP	0.16	NAMP	0.03	AMP	0.52	AMP	0.95	NAMP	0.07
BD_12	AMP	0.96	AMP	0.97	AMP	0.99	AMP	0.66	AMP	1	NAMP	0.33

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Se había introducido una sección específica en las secuencias para tener actividad antifúngica y para demostrar que estas secciones se identifican como tales, se utilizó el programa *Antifp*, que al igual que otros programas busca dentro de secuencias de proteínas de cierta longitud, similitudes entre aminoácidos clave que se sabe que tienen una determinada función, en este caso, de antifúngicos. Estos programas se adjuntan a bases de datos con secuencias que tienen esta función ya definida y también probada experimentalmente en el laboratorio. Los resultados obtenidos para esta parte del análisis fueron negativos (NANTI) (no antifúngicos)

para todos los casos. Es decir, a pesar de la adición de una secuencia modificada que se registró como antifúngica dentro del desarrollo de esta proteína, la secuencia junto con las otras secciones no mantuvo su función en ninguno de los casos (Ver Tabla 3). Este mismo programa nos proporcionó información interesante sobre las secuencias introducidas, como su carga neta, los respectivos índices de hidrofobicidad, hidropaticidad, hidrofiliidad, anfipaticidad, así como el peso molecular de cada secuencia y su punto isoeléctrico.

Tabla 3. Características antifúngicas. En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis de las secuencias diseñadas para predecir si tuvieron un efecto antifúngico. Se probaron las doce secuencias diseñadas y se determinaron la hidrofobicidad, hidropaticidad, anfipaticidad, carga puntual isoeléctrica y peso molecular para cada secuencia utilizando el programa Antifp (Agrawal *et al.*, 2018). Donde podemos observar que ninguna de las secuencias tiene un potencial efecto antifúngico con el resultado (NANTI).

ID	Score	Prediction	Hydrophobicity	Hidropaticity	Hydrophilicity	Amphipathicity	Charge	pI	Mol wt
BD_3	-0.03	NANTI	-0.16	-1	0.18	0.4	-1	4.95	3851.62
BD_4	0.013	NANTI	-0.51	-2	0.81	0.8	-1	4.95	2263.61
BD_5	0.04	NANTI	-0.51	-2	0.7	0.84	-1	5.06	2966.47
BD_11	-0.03	NANTI	-0.61	-2	1.77	0.84	-12	4.04	4580.04
BD_6	-0.02	NANTI	-0.5	-2	0.69	0.81	-1	5.06	3053.56
BD_9	-0.06	NANTI	0.09	0.44	-0.49	0.09	0	5.88	3844.83
BD_10	-0.26	NANTI	-0.08	-0.2	-0.83	0.44	2	12.01	1819.31
BD_8	0.25	NANTI	-0.48	-2.34	-0.84	0.98	4	12.48	1760.18
BD_7	0.02	NANTI	-0.4	-2.21	-1.07	0.89	4	12.48	1946.41
BD_12	0.003	NANTI	-0.31	-1.83	-0.8	0.68	12	13.05	6494.01

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

En el desarrollo de proteínas diseñadas con potencial terapéutico es indispensable evaluar una serie de propiedades funcionales y de seguridad que permitan anticipar su viabilidad biológica. Entre los criterios más relevantes se encuentran la ausencia de actividad hemolítica, la posible capacidad de inhibir la formación de biofilms bacterianos y la estabilidad estructural, expresada como la vida media estimada en distintos sistemas

experimentales *in vitro*. Estas características resultan críticas para minimizar efectos adversos y maximizar la eficacia del tratamiento.

Para evaluar estos parámetros se emplearon diversas herramientas bioinformáticas especializadas. El servidor ProtParam fue utilizado para estimar la vida media de los constructos proteicos en modelos celulares estándar, incluyendo levaduras, reticulocitos y *Escherichia coli*. El programa BIOFIN permitió analizar el potencial de los diseños para inhibir la formación de biofilms bacterianos, mientras que HemoPI se empleó para predecir la probabilidad de actividad hemolítica de cada secuencia diseñada.

Todos los constructos generados fueron sometidos de manera sistemática a estas tres pruebas. Los resultados de ProtParam indicaron que la mayoría de los diseños presentaron una vida media aproximada de 30 minutos en modelos de levaduras, alrededor de 1 hora en reticulocitos y hasta 10 horas en modelos de *E. coli*. De manera notable, los constructos BD_9 y BD_10 mostraron una estabilidad considerablemente mayor, con una vida media estimada de 30 horas en reticulocitos, 20 horas en levaduras y 10 horas en *E. coli*, posicionándose como los candidatos más estables en esta etapa del análisis (ver Tabla 4).

En cuanto a la evaluación de toxicidad potencial mediante HemoPI, el constructo BD_11 obtuvo el valor más favorable, con un puntaje PROB = 0, lo que indica una probabilidad nula de actividad hemolítica. A este le siguieron los diseños BD_3, BD_2 y BD_1, con valores de 0.11, 0.14 y 0.18, respectivamente, todos ellos clasificados como muy poco probables de presentar efectos hemolíticos. Estos resultados sugieren un perfil de seguridad adecuado para su consideración como candidatos terapéuticos.

Finalmente, el análisis realizado con BIOFIN indicó que ninguno de los diseños evaluados presenta un potencial inhibidor significativo de la formación de biofilms bacterianos (ver Tabla 4). Si bien esta propiedad no se observó en los constructos diseñados, su ausencia no invalida el enfoque terapéutico propuesto, dado que el objetivo principal se centra en la interacción directa con patógenos específicos y en la modulación de la microbiota asociada.

Tabla 4. Propiedades de las secuencias diseñadas. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para el análisis de propiedades de las secuencias diseñadas. Las propiedades de la vida media de las proteínas se analizaron con el programa ProtParam (Walker *et al.*, 2005). Esto nos ofrece tres modelos in vivo diferentes y cuánto tiempo dura la proteína diseñada en estos modelos (reticulocitos, levadura y *E. coli*), lo que nos ayuda a saber cuánto tiempo podría durar el efecto de las proteínas diseñadas in vivo y si las expresamos en modelos heterólogos. Los resultados del programa BIOFIN (Gupta *et al.*, 2016) nos ayudan a saber si la proteína modificada tendría algún efecto sobre la formación de biopelículas. Y, por último, HemoPI presenta un PROB Score normalizado que muestra rangos de valores entre 0 y 1 (1: muy probable que sea hemolítico y 0: muy poco probable que sea hemolítico) (Chaudhary *et al.*, 2016).

ID	ProtParam			BIOFIN		HemoPI
	Reticulocitos	levadura	<i>E. coli</i>	Score	Prediction	PROB Score (Hemolytic)
BD_1	1h	30min	>10h	-0.659775	Negative	0.18
BD_2	1h	30min	>10h	-0.411233	Negative	0.14
BD_3	1h	30min	>10h	-1.19434	Negative	0.11
BD_4	1h	30min	>10h	0.189585	Negative	0.4
BD_5	1h	30min	>10h	-0.521029	Negative	0.47
BD_6	1h	30min	>10h	-0.732722	Negative	0.47
BD_7	1h	2min	2min	-0.235444	Negative	0.76
BD_8	1h	2min	2min	-0.274915	Negative	0.78
BD_9	30h	>20h	>10h	-0.442545	Negative	0.27
BD_10	30h	>20h	>10h	-0.122223	Negative	0.87
BD_11	1h	30min	10min	-0.223023	Negative	0
BD_12	1h	2min	2min	-1.00677	Negative	0.93

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Con base en los resultados obtenidos en las etapas previas de evaluación funcional, estabilidad y seguridad, se seleccionaron los constructos con mejor desempeño global para el análisis detallado de las interacciones receptor–proteína, empleando los programas de acoplamiento molecular HEX (loria) y HADDOCK. Hasta este punto del estudio, la mayoría de los análisis realizados no requerían información estructural explícita; sin embargo, para la

evaluación de afinidad y modos de unión específicos, fue indispensable contar con modelos estructurales tridimensionales de las proteínas diseñadas.

Las secuencias seleccionadas se introdujeron en el programa de predicción estructural I-TASSER, el cual permite generar modelos *de novo* con alta robustez para secuencias sin homólogos estructurales cercanos. Los modelos resultantes fueron evaluados internamente por el servidor, etiquetados conforme a su calidad de plegamiento y descargados en formato PDB para su posterior análisis estructural y de acoplamiento molecular.

Los constructos que obtuvieron las mejores puntuaciones globales considerando estabilidad, potencial antimicrobiano, baja toxicidad y calidad estructural fueron BD_7, BD_8, BD_9, BD_10, BD_11 y BD_12, los cuales fueron seleccionados como candidatos finales para los estudios de interacción molecular (Ver Figura 34).

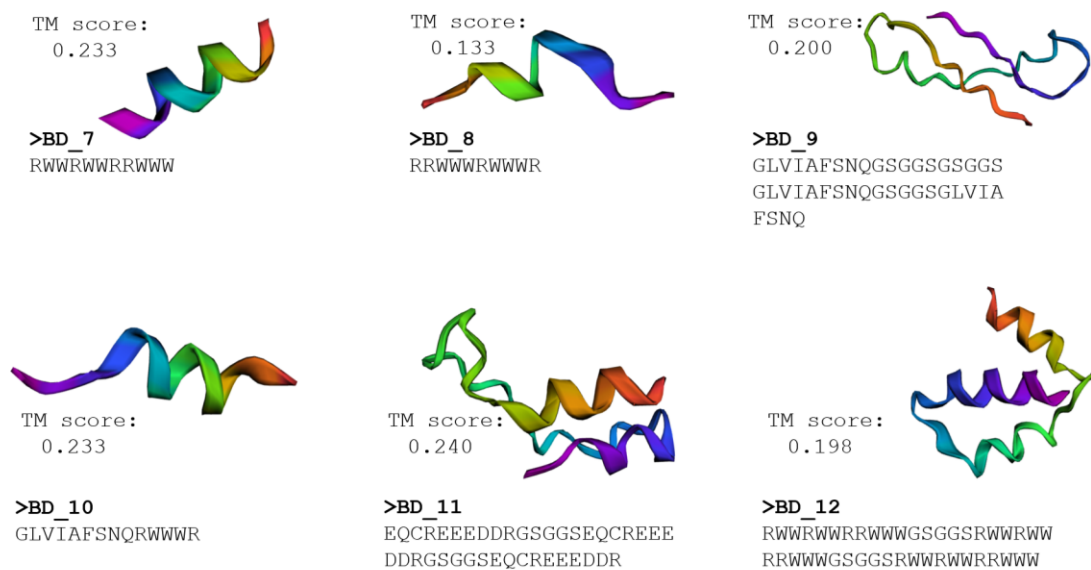


Figura 34. Modelos después de las pruebas de filtro. En la siguiente figura se muestra el modelado de las secuencias que han pasado los filtros mencionados anteriormente. Así como su puntuación y secuencia de TM. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Dado que ninguno de los diseños iniciales presentó actividad antifúngica significativa en las pruebas predictivas, se procedió a incorporar un módulo adicional con actividad antifúngica predicha, con el objetivo de obtener un constructo terapéutico integral dirigido tanto contra *Bd* como contra los patógenos bacterianos asociados.

En particular, se priorizaron aminoácidos asociados con flexibilidad conformacional, capacidad de formar cavidades o *pockets* funcionales, presencia de anillos aromáticos, así como glicinas, cisteínas y residuos con carga positiva, dada su relevancia en la estabilidad estructural, la interacción con membranas y la actividad antimicrobiana. La disposición y distribución de estos aminoácidos dentro de la secuencia final se realizó siguiendo los principios y formulaciones propuestas por Shai *et al.* (2002), con el objetivo de maximizar la anfipaticidad, la complementariedad electrostática y el potencial de interacción con las dianas moleculares seleccionadas (Ver Figura 35).

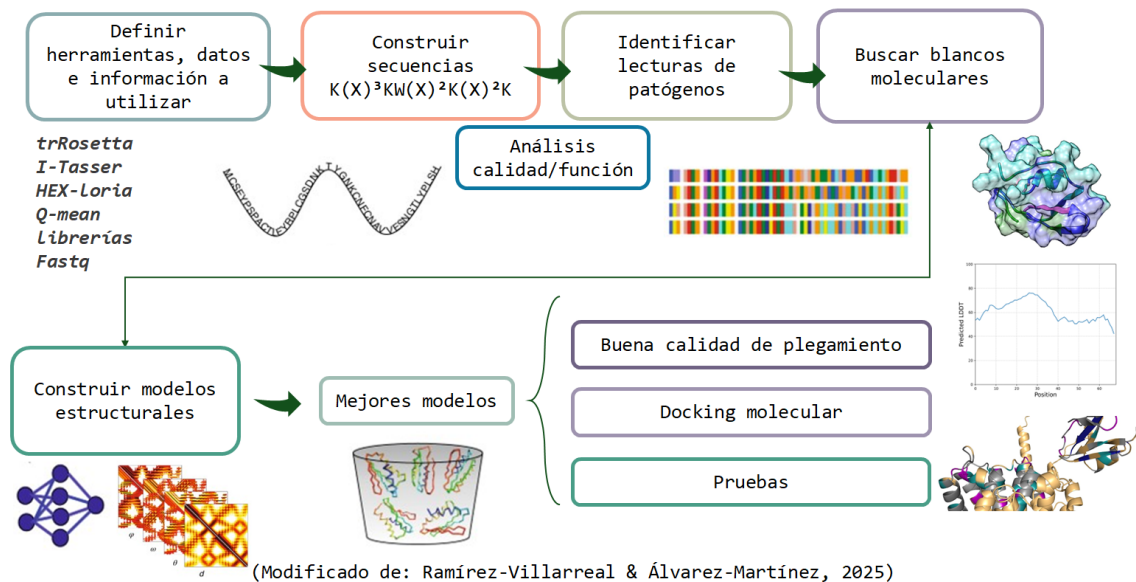


Figura 35. Proceso de construcción proteína anti-*Bd*. En la siguiente figura muestra la sección LC5 en estructura, cada color (naranja, amarillo, verde y azul) representa una

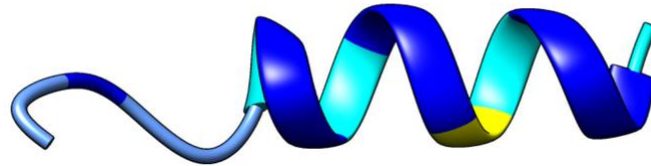
característica específica de los aminoácidos presentes. T M-score: valor de calidad en la resolución del plegamiento de la estructura. También se muestra el resultado del posible acoplamiento molecular entre receptor-proteína y finalmente los resultados de estimación para la vida media de la proteína, si el péptido es estable y su potencial como antifúngico. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025a.

El resultado del procedimiento de diseño fue la obtención de un modelo estructural tridimensional de la proteína terapéutica propuesta. Mediante simulaciones estructurales y análisis de estabilidad, se confirmó que los distintos segmentos de la secuencia presentan conformaciones estables, compatibles con una vida media estimada del péptido de aproximadamente una a una hora y media en condiciones ambientales. La conformación predominante de la proteína corresponde a una estructura helicoidal, característica que favorece su capacidad de interacción con membranas celulares.

Este tipo de estructura helicoidal es consistente con mecanismos previamente descritos para proteínas y péptidos bioactivos, en los cuales la interacción electrostática inicial con membranas cargadas negativamente facilita la inserción parcial o completa de la hélice en la bicapa lipídica, potenciando su función biológica (Silva *et al.*, 2020; Rádis-Baptista, 2021; Takahashi *et al.*, 2024). En este contexto, la carga neta positiva de la proteína diseñada contribuye a una interacción favorable con membranas fúngicas, reforzando su potencial antifúngico.

La integración de este nuevo componente se realizó mediante el uso de secuencias cortas y flexibles de aminoácidos, seleccionadas del Registry of Standard Biological Parts (iGEM), las cuales cumplen funciones de enlace (*linkers*) y favorecen el plegamiento adecuado de proteínas quiméricas. Estas secuencias permitieron vincular de manera estructural y funcional los constructos originales BD_# con la nueva secuencia antifúngica, denominada LC5, minimizando interferencias estéricas y promoviendo un plegamiento conformacional estable (Ver Figura 36).

Sequence	KAAAKWLLKIIKCCPCC
Prediction	CHHHHHHHHHCCCCC
Conf. Score	9189999998017899
	H:Helix; S:Strand; C:Coil



TM-score : 0.63

	aromatic amino acid
	(+) amino acid
	cysteine
	(-) amino acid

Figura 36. Modelo anti-Bd. En la siguiente figura se muestra la sección LC5 también diseñada a partir de la secuencia, siguiendo el procedimiento realizado para las secuencias con efectos antimicrobianos. Cuenta con diferentes secciones en amarillo, cian, azul y azul marino. Cada parte asegura la estabilidad del péptido y parte de la secuencia asegura la unión a membranas cargadas negativa y neutralmente (Modificada de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025).

Como resultado de esta estrategia de ensamble modular, el nuevo diseño proteico quedó conformado por cuatro secciones funcionales principales:

1. Regiones enriquecidas en aminoácidos con carga negativa,
2. Regiones con predominio de aminoácidos cargados positivamente,
3. Dominios con aminoácidos aromáticos implicados en interacciones hidrofóbicas y de membrana, y
4. Una cola rica en cisteínas, cuya función es conferir estabilidad estructural global mediante la posible formación de enlaces disulfuro, contribuyendo tanto a la integridad del módulo LC5 como a la estabilidad de los dominios BD originales.

Este módulo antifúngico fue denominado LC5, y los constructos finales resultantes de la fusión se designaron como BD#-LC5, reflejando su naturaleza quimérica y su diseño multi-blanco orientado a la inhibición simultánea del patógeno fúngico y de bacterias oportunistas asociadas a estados de disbiosis (Ver Figura 37).

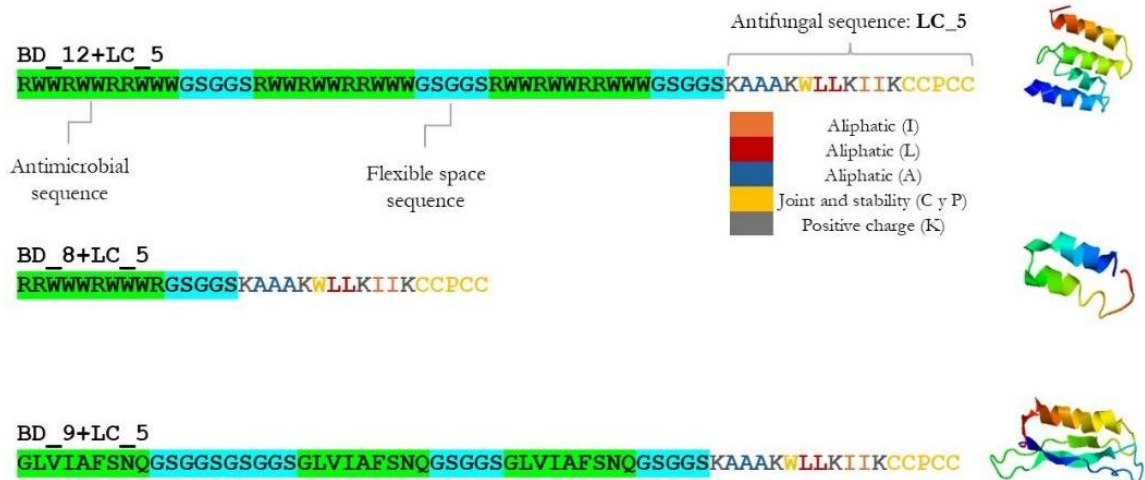


Figura 37. Construcción de una secuencia con múltiples dianas moleculares. En la siguiente figura podemos ver el esquema de construcción de las mejores secuencias que pasaron los filtros de las pruebas anteriores (acoplamiento molecular, *Antifp*, CAMPr4, ProtParam, BIOFIN y HemoPI) en conjunto con una nueva secuencia que activa un efecto antifúngico específico para *Bd* en las proteínas diseñadas. La secuencia específica anti-*Bd* se muestra en la figura, señalada en verde y cian. En la región N-terminal podemos ver la secuencia anti-*Bd* con los colores naranja, rojo, azul, amarillo y gris. Estas nuevas secuencias se han nombrado de acuerdo con el primer nombre de secuencia BD+ el número de secuencia + la secuencia antifúngica LC_5= BD#LC5, que es igual a BD12LC5, BD8LC5, BD9LC5 y BD11LC5. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Finalmente, una vez verificado que cada módulo funcional de la secuencia quimérica se encontraba correctamente integrado, se procedió a evaluar si la proteína completa presenta afinidad por paredes y membranas celulares, las cuales, para los fines de este estudio, fueron asumidas con carga neta negativa, en concordancia con la composición típica de membranas bacterianas y fúngicas.

Para este análisis se empleó un programa de predicción de interacciones proteína–membrana, el cual clasifica a los péptidos o proteínas en tres categorías funcionales: BINDER, cuando se predice una unión o interacción estable con la membrana; NON-BINDER, cuando la secuencia carece de residuos con capacidad de interacción; y SENSOR, cuando la proteína no se une de manera estable, pero puede presentar interacciones transitorias o dependientes del contexto conformacional.

Los modelos estructurales BD8LC5, BD9LC5 y BD11LC5 fueron sometidos a este análisis. En los tres casos, el programa los clasificó como BINDER, lo que indica una alta probabilidad de interacción directa con membranas celulares. Adicionalmente, se logró identificar con precisión la localización de los residuos y motivos responsables de dicha interacción, observándose que cada proteína presenta múltiples regiones con capacidad de unión a membrana, resultado que coincide con el diseño multiseccional planteado (Ver Figura 38-40).

En el constructo BD8LC5, las secuencias RRWWWRWWWRGSGG, KAAAK, LKI y la arginina en la posición 27 fueron predichas como regiones con afinidad por membrana. Para la proteína BD9LC5, se identificó una región con comportamiento tipo SENSOR en la serina posición 30, así como residuos con interacción directa en las argininas 51 y 55, además del motivo estructural conformado por la prolina 61 y las cisteínas 62 y 63, las cuales mostraron una contribución relevante a la interacción con la membrana (Ver Figuras 38-40).

En el caso del constructo BD11LC5, se identificaron múltiples residuos con capacidad de interacción, incluyendo la asparagina en la posición 1, el triptófano en la posición 25, la cisteína en la posición 4, el triplete de argininas en las posiciones 5, 27 y 28, así como el motivo estructural compuesto por la prolina 67, cisteínas 68 y 69, y la secuencia rica en

residuos cargados y aromáticos RWWRRWW, todos ellos clasificados como regiones de unión a membrana (Ver Figuras 38-40).

En conjunto, estos resultados confirman que los constructos BD-LC5 poseen múltiples dominios funcionales capaces de interactuar con membranas cargadas negativamente, lo que respalda su diseño racional como proteínas con potencial antimicrobiano y antifúngico, capaces de actuar mediante mecanismos de interacción directa con superficies celulares.

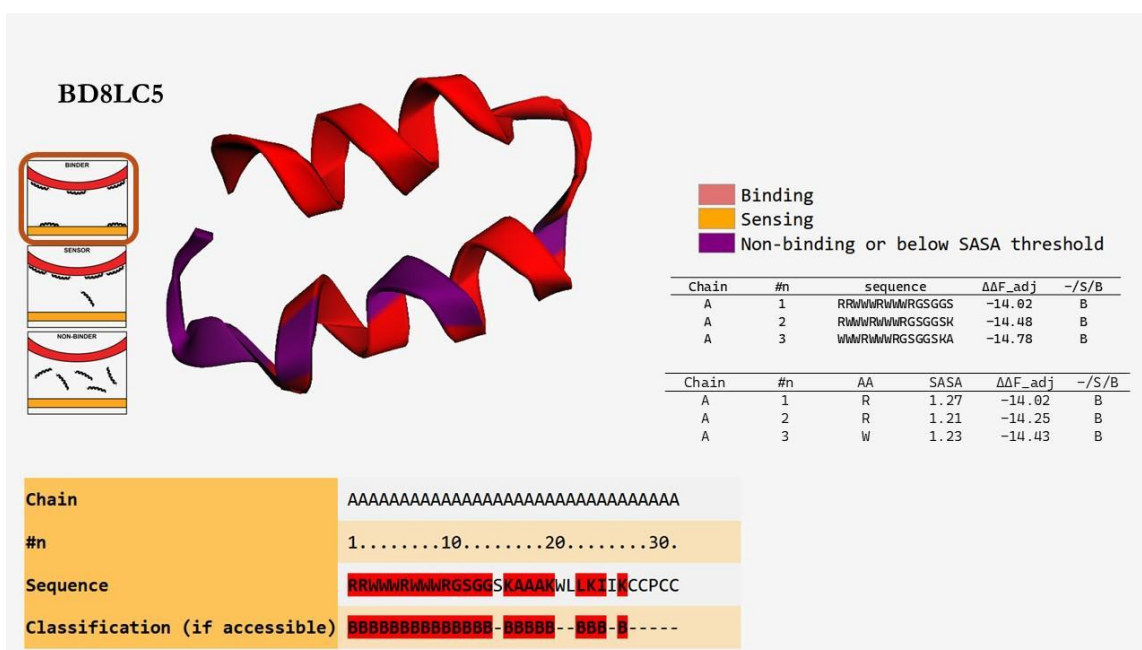


Figura 38. Ensayo de unión a membranas (BD8LC5). La siguiente figura muestra la prueba de unión a membranas, que predice las secciones de secuencia y los aminoácidos que se unirán a las membranas cargadas negativamente o con carga neutra. Los resultados mostrados son para las membranas cargadas negativamente, aunque se realizaron también pruebas para las membranas neutras, en los dos casos se obtuvieron resultados similares. Las secciones con unión predicha se muestran en rojo tanto en el modelo de proteína como en la secuencia. Además, se muestran las primeras filas de la tabla de resultados en donde se menciona que valores de energía fueron calculados en el proceso. El umbral utilizado para

estas pruebas fue de 0,8. En todos los casos se encontraron resultados positivos. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

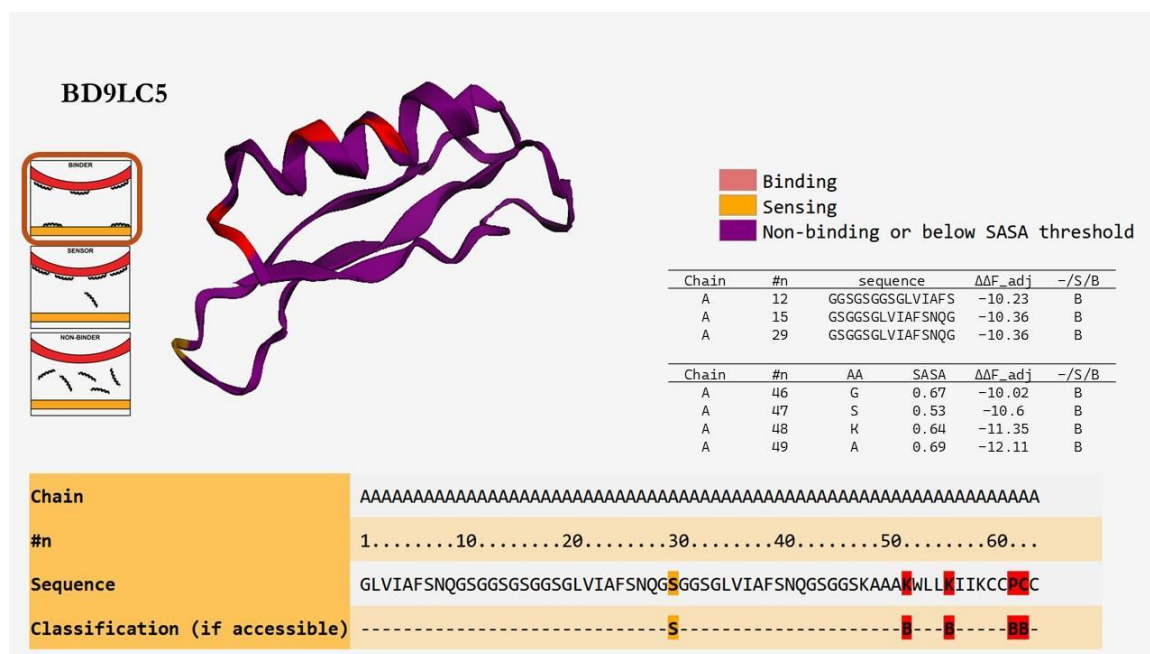


Figura 39. Ensayo de unión a membranas (BD9LC5). La siguiente figura muestra la prueba de unión a membranas, que predice las secciones de secuencia y los aminoácidos que se unirán a las membranas cargadas negativamente o con carga neutra. Los resultados mostrados son para las membranas cargadas negativamente, aunque se realizaron también pruebas para las membranas neutras, en los dos casos se obtuvieron resultados similares. Las secciones con unión predicha se muestran en rojo tanto en el modelo de proteína como en la secuencia. Además, se muestran las primeras filas de la tabla de resultados en donde se menciona que valores de energía fueron calculados en el proceso. El umbral utilizado para estas pruebas fue de 0,8. En todos los casos se encontraron resultados positivos. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

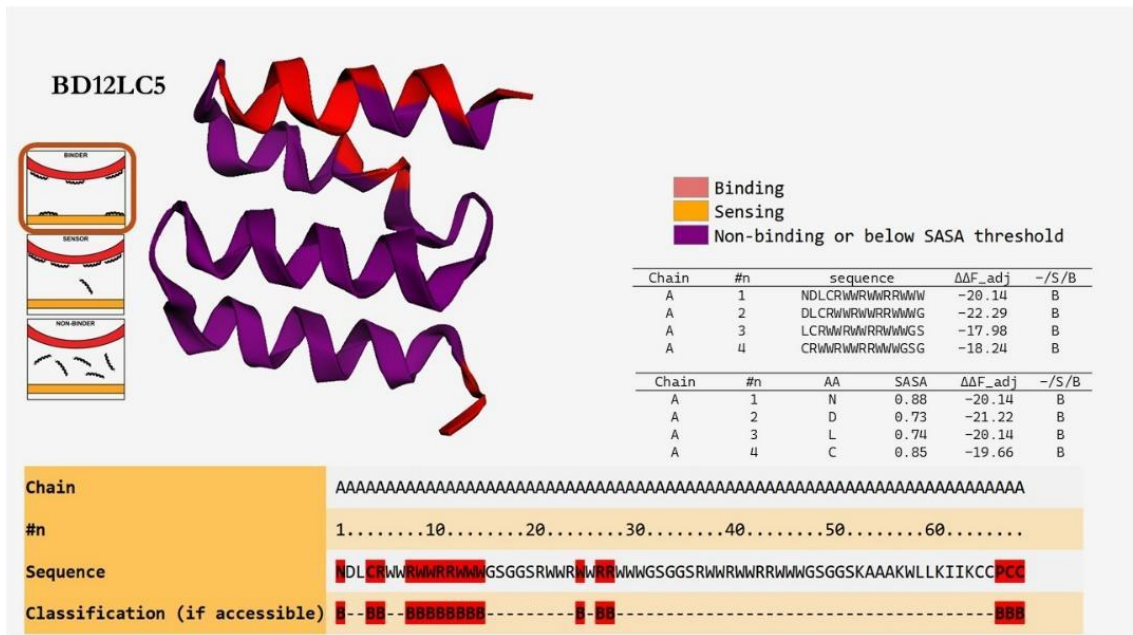


Figura 40. Ensayo de unión a membranas (BD12LC5). La siguiente figura muestra la prueba de unión a membranas, que predice las secciones de secuencia y los aminoácidos que se unirán a las membranas cargadas negativamente o con carga neutra. Los resultados mostrados son para las membranas cargadas negativamente, aunque se realizaron también pruebas para las membranas neutras, en los dos casos se obtuvieron resultados similares. Las secciones con unión predicha se muestran en rojo tanto en el modelo de proteína como en la secuencia. Además, se muestran las primeras filas de la tabla de resultados en donde se menciona que valores de energía fueron calculados en el proceso. El umbral utilizado para estas pruebas fue de 0,8. En todos los casos se encontraron resultados positivos. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

En total, tres constructos presentaron el mejor desempeño global al superar satisfactoriamente todos los filtros y pruebas aplicadas a lo largo del proceso de evaluación. Estos modelos fueron seleccionados para analizar en detalle su potencial de afinidad e

interacción con dianas moleculares específicas localizadas en la membrana, etapa crítica para validar su viabilidad funcional como tratamiento multi-blanco.

Para este análisis se emplearon los programas HEX (loria) y UCSF Chimera. Chimera se utilizó principalmente para la visualización y análisis espacial de las estructuras tridimensionales, mientras que HEX loria se empleó para realizar los ensayos de acoplamiento molecular, cuyos cálculos permiten estimar la probabilidad de interacción entre la proteína diseñada y las proteínas receptoras de membrana. En este contexto, las proteínas de membrana de la superfamilia MFS provenientes de *Vibrio fluvialis*, *Acinetobacter baumannii*, *Edwardsiella tarda* y *Yersinia pestis* fueron utilizadas como receptores, y se evaluaron frente a los constructos BD8LC5, BD9LC5 y BD12LC5 (Ver Figura 41).

La selección final del candidato más prometedor se realizó con base en los resultados del acoplamiento molecular, considerando varios criterios fundamentales: (i) que la proteína diseñada se localizara lo más próxima posible a la proteína diana; (ii) que dicha interacción ocurriera en el plano extracelular de la membrana plasmática, condición necesaria para la viabilidad biológica del mecanismo propuesto; y (iii) que estos atributos se cumplieran de manera consistente en las cuatro proteínas diana, o al menos en la mayoría de ellas.

Bajo estos criterios, el modelo BD8LC5 fue el que mejor se ajustó al conjunto de supuestos planteados, mostrando interacciones favorables en tres de los cuatro blancos moleculares evaluados, correspondientes a *Acinetobacter baumannii*, *Edwardsiella tarda* y *Yersinia pestis*. No obstante, en el caso de *Vibrio fluvialis*, patógeno identificado de manera recurrente en los análisis previos, el resultado fue menos favorable, porque el acoplamiento de la proteína diseñada se localizó predominantemente en la región inferior de la proteína diana, correspondiente al lado intracelular de la membrana plasmática, lo que limita su plausibilidad funcional como sitio de interacción efectiva (Ver Figura 41).

En conjunto, estos resultados posicionan a BD8LC5 como el mejor candidato global dentro del marco de este estudio, al presentar un patrón de interacción consistente y biológicamente plausible en la mayoría de las dianas moleculares evaluadas (Ver Figura 41).

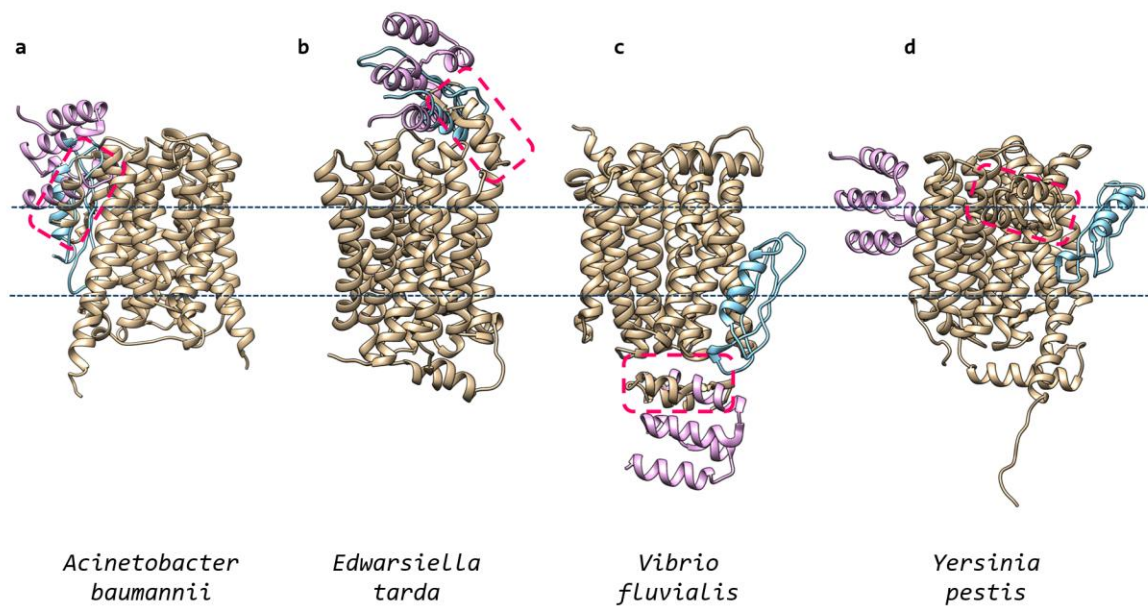


Figura 41. Acoplamiento molecular final. La figura muestra las estructuras de cada proteína diana presente en cada una de las bacterias patógenas en color arena. Las marcas en color rosa indican la ubicación de la proteína tratamiento BD8LC5, después en distintos colores los tratamientos: BD9LC5 en azul y BD12LC5 en violeta. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

Asimismo, se evaluó el posible acoplamiento molecular entre la proteína diseñada y el receptor seleccionado en *Bd*. Los resultados del análisis de *docking* indican la existencia de una interacción estructural potencial entre ambas proteínas, con regiones específicas de contacto claramente identificables. Las estimaciones de energía obtenidas muestran valores negativos en parámetros clave, como la energía total (*E energy*), la energía de solvatación (*D energy*) y la contribución de fuerzas de Van der Waals (VDW), lo cual es indicativo de una aproximación favorable y estable entre las estructuras proteicas (Ver Figura 42).

Adicionalmente, se analizaron propiedades funcionales del péptido correspondiente a la región LC5. Las estimaciones de vida media mostraron valores variables en función del contexto de evaluación (*in vivo* o *in vitro*), aunque dentro de rangos compatibles con

actividad biológica. La estabilidad global del péptido fue confirmada como adecuada para su función prevista, y su potencial antifúngico fue corroborado mediante el programa *Antifp*, respaldando la funcionalidad del diseño propuesto (Ver Figura 42).

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína diseñada presenta características estructurales, fisicoquímicas y funcionales consistentes con un candidato terapéutico viable, capaz de interactuar de manera específica con su diana molecular y de ejercer actividad antifúngica potencial frente a *Bd*.

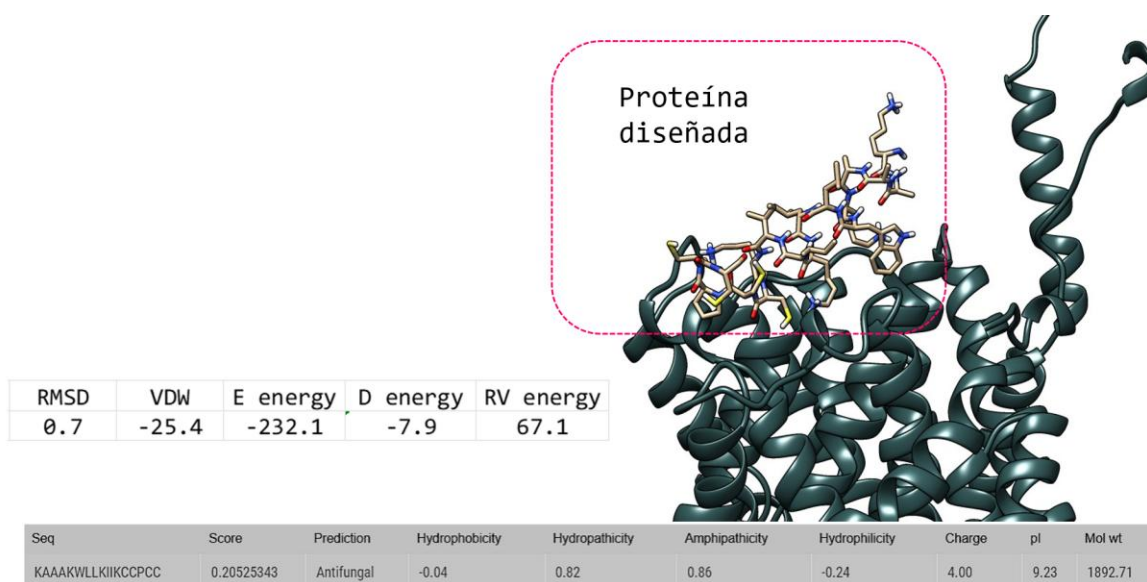


Figura 42. Modelo anti-*Bd*. En la siguiente figura muestra la sección LC5 en estructura, cada color (naranja, amarillo, verde y azul) representa una característica específica de los aminoácidos presentes. TM-score: valor de calidad en la resolución del plegamiento de la estructura. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

Con el fin de ilustrar el mecanismo de acción potencial de las proteínas terapéuticas diseñadas *in silico*, este proyecto planteó un modelo conceptual que pudiera ser posteriormente contrastado mediante ensayos *in vitro*. Bajo este marco, se espera que la proteína diseñada exhiba la actividad funcional prevista, comenzando con una interacción inicial con la pared

celular del hongo *Bd*, seguida de una acción directa a nivel de la membrana plasmática, tanto del patógeno fúngico como de las bacterias oportunistas asociadas (Ver Figura 42, Tabla anexa color gris).

La hipótesis funcional plantea que la interacción específica entre la proteína terapéutica y las dianas moleculares seleccionadas conduciría a la truncación o inhibición de la actividad normal de dichas proteínas receptoras. Esta inferencia se sustenta en el hecho de que, durante la selección de los blancos moleculares, se consideraron explícitamente aspectos clave de su mecanismo de acción, activación y función fisiológica, lo que permite anticipar las consecuencias funcionales de una interferencia estructural.

En el caso particular del hongo *Bd*, la proteína seleccionada como diana corresponde a un antiportador de sodio/protones (Na^+/H^+), cuya función principal es mantener el equilibrio osmótico celular, un proceso crítico que permite al patógeno adaptarse y sobrevivir tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Clemons *et al.*, 2023). La correcta actividad de este transportador depende de cambios conformacionales dinámicos, en los cuales determinadas hélices transmembrana rotan o se desplazan hacia arriba o hacia abajo en función del estado abierto o cerrado del canal.

La unión de una proteína exógena diseñada racionalmente a regiones estratégicas de estas hélices podría restringir o bloquear dichos movimientos conformacionales, impidiendo la transición funcional del transportador y, en consecuencia, interrumpiendo el mantenimiento del gradiente iónico necesario para la homeostasis celular. De esta manera, incluso una interacción parcial o estéricamente desfavorable puede ser suficiente para comprometer la función del antiportador.

Este tipo de transportadores resulta particularmente relevante en el contexto de la patogenicidad de *Bd*, su capacidad para regular el balance osmótico contribuye directamente a su versatilidad ecológica y a su eficiencia infectiva en distintos ambientes, característica que incrementa su peligrosidad como patógeno emergente. En conjunto, el mecanismo propuesto respalda el diseño racional de la proteína terapéutica como un agente capaz de

interferir con procesos celulares esenciales, tanto en el hongo quítrido *Bd* como en bacterias patógenas asociadas.

Las interacciones electrostáticas y la inserción de hélices proteicas en la membrana plasmática constituyen elementos centrales del mecanismo de acción esperado para la proteína terapéutica diseñada. Las cargas presentes tanto en la superficie de la membrana como en la proteína generan fuerzas de atracción electrostática que, aunque de naturaleza relativamente débil, son suficientes para facilitar el acercamiento inicial y permitir eventos posteriores de interacción más específicos. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en la literatura, particularmente en proteínas y toxinas con actividad sobre membranas, las cuales suelen presentar estructuras dominadas por hélices α o arreglos tipo barril α , configuraciones que favorecen la inserción y estabilización dentro del entorno lipídico (Kini y Koh, 2020).

Si bien los determinantes exactos que permiten la inserción eficiente de proteínas en la membrana aún no se comprenden por completo, diversos estudios han identificado a ciertos aminoácidos como elementos clave en este proceso. Entre ellos destacan la arginina y el triptófano, cuyos grupos funcionales favorecen interacciones tanto electrostáticas como hidrofóbicas con los fosfolípidos de la membrana. Estos residuos fueron incorporados deliberadamente en el diseño de la proteína terapéutica con el objetivo de potenciar su afinidad por superficies cargadas negativamente y facilitar su inserción parcial o transitoria en la membrana plasmática (Ver Figura 43).

En el caso de las bacterias patógenas, las proteínas de la superfamilia *Major Facilitator* (MFS) cumplen funciones esenciales en el transporte de solutos, nutrientes y en el intercambio iónico necesario para el mantenimiento del pH intracelular. A diferencia del antiportador Na^+/H^+ seleccionado en *Bd*, estas proteínas presentan un mecanismo de acción caracterizado por un movimiento de apertura y cierre similar al de un canal, dependiente de cambios conformacionales coordinados, aunque sin rotaciones helicoidales pronunciadas. Este comportamiento dinámico hace que las regiones extracelulares y las cavidades

superficiales de las proteínas MFS sean particularmente sensibles a interferencias estructurales (Ver Figura 43).

Con base en ello, el diseño terapéutico se orientó a identificar y explotar cavidades accesibles en la superficie extracelular de las proteínas MFS, las cuales contienen aminoácidos con propiedades fisicoquímicas compatibles con interacciones específicas con los residuos presentes en la proteína diseñada. La unión de una proteína exógena a estas regiones puede interferir con la dinámica conformacional necesaria para el funcionamiento normal del transportador, alterando así su actividad fisiológica (Quistgaard *et al.*, 2016).

Cabe destacar que, en numerosas bacterias, los transportadores MFS también funcionan como bombas de eflujo, participando activamente en la expulsión de fármacos y contribuyendo al desarrollo de resistencia antimicrobiana (K. Redhu *et al.*, 2016). La literatura científica ha demostrado que la interacción de proteínas no específicas con estos canales dependientes de conformación puede modificar sus estados de apertura o cierre, afectando directamente su funcionalidad (Hodi *et al.*, 2010).

En conjunto, la función esperada de la proteína diseñada *in silico* es truncar o interferir la actividad de estas proteínas de membrana, lo que podría generar efectos celulares inmediatos, tales como la alteración del equilibrio osmótico, la incapacidad de regular el pH intracelular, la disminución en la captación de solutos y nutrientes esenciales y, de manera crítica, la inhibición de los mecanismos de eflujo, favoreciendo la acumulación intracelular de antibióticos o compuestos terapéuticos. Este mecanismo integrado sustenta el enfoque multi-blanco propuesto y refuerza el potencial del diseño como estrategia terapéutica innovadora frente a *Bd* y bacterias oportunistas asociadas (Ver Figura 43).

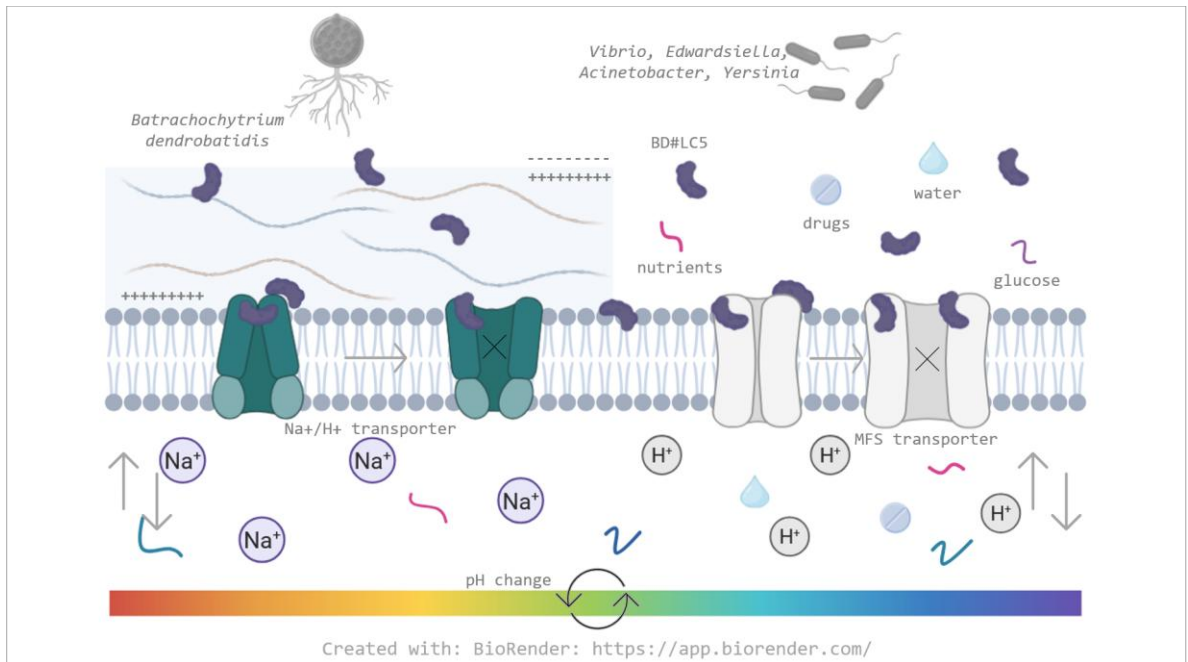


Figura 43. Mecanismo de acción de la proteína tratamiento. El mecanismo de acción se basa en la interacción química y física que pueda haber entre los aminoácidos del receptor y del ligando. Además de las posibles interacciones en secciones tipo “*pocket*” o cavidades, que presentan las propiedades fisicoquímicas ideales para ser blancos de unión para proteínas diversas. Al final, la unión de la proteína, en una concentración específica, puede generar una mala función o truncar la función correcta de los receptores y canales. Esto puede inducir un desbalance osmótico en las células. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2026.

DISCUSIÓN

Los trabajos en los que se estudia la microbiota de las salamandras son numerosos; sin embargo, los trabajos que hacen una detección de la infección son escasos. Es debido a esta razón por la que se encontró un número de artículos limitados con esta información. Aun con esta limitante en el estudio se logró identificar a diferentes bacterias con posibilidad de ser patógenas para todos los animales de la base de datos generada.

Las bacterias diferenciales entre los animales infectados y no infectados por *Bd*, son distintas incluso para cada especie de salamandra y podrían estar involucrados aspectos como la carga de *Bd* en la piel (Bletz *et al.*, 2018). Además, se encontraron proporciones similares de Proteobacterias, Bacteroidetes, Actinobacterias y Firmicutes que fueron identificadas en salamandras sanas del género *Salamandra salamandra* las cuales también fueron identificadas durante este estudio para las salamandras *Eurycea*, *Notophthalmus* y *Desmognathus* (Bletz *et al.*, 2018).

La comparación de los resultados incluso de los de LEfSe, muestra que las diferencias de microbiota entre animales sanos e infectados por *Bd* también están presentes entre especies de salamandras y entre cepas del hongo quítrido (Bletz *et al.*, 2018). No se encontraron diferencias significativas en las abundancias ni en los índices de diversidad, lo que también coincide con otros estudios, en los que se ha informado que posiblemente la infección por *Bd* no altera ninguno de estos aspectos en salamandras (Bletz *et al.*, 2018).

Es probable que las salamandras en general mantengan un control menos riguroso en las poblaciones de microorganismos presentes en su piel, debido a que pueden producir una menor cantidad de mucosidad con respecto a algunos anuros. El mantener a las comunidades beneficiosas para la piel podría requerir un elevado costo de mantenimiento (Bletz *et al.*, 2018). Otra posibilidad, es que podrían utilizar esos recursos, para inducir la colonización de microorganismos que ayuden a su adaptación a la contaminación del medio ambiente; que se ha visto en ranas, las cuales adquieren poblaciones de microorganismos que son capaces de impedir/reducir la permeabilidad de su piel al arsénico, lo que favorece la adaptación de las

ranas a este contaminante y es probable que algunos de estos microorganismos se encuentren en la lista de bacterias oportunistas (Cordeiro *et al.*, 2024).

En este capítulo -el número tres de esta tesis- se encontraron cambios en la composición de la microbiota de los animales con infección y sin infección. La mayoría de las bacterias encontradas como diferenciales entre condiciones están relacionadas con infecciones emergentes y oportunistas en ranas, como es el caso de *Klebsiella* y *Elizabethkingia*, aunque en este caso el programa no pudo identificar la especie, estos géneros son clasificados como resistentes a antibióticos (Li *et al.*, 2023). Hay estudios que demuestran que ciertas bacterias comensales y patógenas como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, pueden promover la regeneración o la cicatrización de heridas por la producción de ciertos lipopolisacáridos, estos procesos han sido estudiados en *Xenopus* (Chapman *et al.*, 2024). Lo cual podría explicar su presencia en algunas de las muestras aquí analizadas.

Los componentes bacterianos presentes en la piel de las salamandras son dependientes en gran manera de las bacterias que se encuentran en el medio en donde habitan. Las condiciones ambientales favorables en el medio donde las salamandras se desenvuelven promueven la presencia de ciertos microorganismos que son beneficiosos para la protección del hospedero ante patógenos; por lo tanto, el microbioma de la piel de estos animales depende mucho de factores externos que podrían explicar las diferencias de microbiota vistas (Zhu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024; Chew *et al.*, 2024).

Al igual que en el caso de las ranas que no presentan infección por *Bd*, pudimos encontrar altas abundancias del phylum Proteobacteria (48%) en animales sanos y de Actinobacteria, sin embargo, para el caso de Firmicutes, se encontró una menor proporción en este estudio (Mutnale *et al.*, 2021). En el mismo sentido, la identificación de *Acinetobacter* en las salamandras con infección por *Bd*, coincide con resultados de la rana *Hoplobatrachus rugulosus*, la cual presenta esta bacteria cuando en la piel presenta úlceras o heridas profundas, lo que podría coincidir con el daño que provoca el hongo quítrido en la piel (Hu *et al.*, 2022).

Muchos de los patógenos identificados en las listas de microorganismos como el caso del género *Yersinia*, hay registros que el nivel de patogenicidad que pueda tener esta bacteria está conferido por su capacidad de capturar hierro; lo que podría responder a la pregunta, del porqué, aunque los patógenos están presentes en la piel no producen enfermedad en el hospedero. Así como esa clase de eventos puede influir, también han de existir muchos más factores involucrados que aún se desconocen (Carniel, 2001; Zhang *et al.*, 2024; Chew *et al.*, 2024).

Los resultados en este estudio no están alejados de la realidad vista en otros estudios de microbiota. Al analizar microbiota de pacientes que presentan una condición de salud distinta, se han encontrado semejanzas en las abundancias relativas a nivel de Familia y género, así como en este proyecto (Joseph Madison *et al.*, 2025; Salazar *et al.*, 2025; Jiménez *et al.*, 2019). En este trabajo se encontraron en el análisis de componentes bacterianos a nivel de género, bacterias que han sido catalogadas como abundantes en la microbiota cutánea de anfibios; también, algunos otros géneros que han sido identificados en la literatura con funciones de defensa inmunológica en estos animales debido a la producción de antimicrobianos y antifúngicos. La protección ante patógenos fúngicos y otras funciones de relevancia como la tolerancia a distintas concentraciones salinas y la tolerancia a exposición de compuestos orgánicos, debido a su degradación por ciertos géneros de bacterias presentes en nuestras muestras también ha sido descrito en literatura reciente (Joseph Madison *et al.*, 2025; Salazar *et al.*, 2025; Jiménez *et al.*, 2019).

Otros aspectos como los índices alfa y beta en la microbiota, se ha visto que, al compararlos entre pacientes sanos y enfermos en muchas de las ocasiones, no hay diferencias significativas entre los grupos. Esto se ha observado en enfermedades presentes en humanos, tales como enfermedades neurológicas, metabólicas y autoinmunes, incluso ya ha sido ampliamente descrito en enfermedades como la obesidad y la depresión (Gupta *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2019; Plassais *et al.*, 2021; Sze & Schloss, 2016; Kers & Saccenti, 2022). Por lo que los resultados aquí expuestos concuerdan con lo que ya ha sido estudiado

e incluso presentan características semejantes (Gupta *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2019; Plassais *et al.*, 2021; Sze & Schloss, 2016; Kers & Saccenti, 2022).

Cuando se realizaron los análisis ANCOM y Lefse, procurando identificar bacterias marcadoras de la infección por *Bd*; se encontraron bacterias que han sido ampliamente aisladas del suelo, el agua, sedimentos lacustres, incluso hasta bacterias simbiotes. Algunas otras de las bacterias encontradas, han sido identificadas en la superficie de insectos, lombrices, algunas otras de ellas son patógenos de plantas o, por el contrario, presentan funciones probióticas en plantas (Yang *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2025; Ringø, 2024; Leisner *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2019; Dosi *et al.*, 2024; Kosiorek *et al.*, 2024; Tomic-Canic *et al.*, 2020; Hrestak *et al.*, 2022; De Wert *et al.*, 2020; Byrd *et al.*, 2018).

En cuanto a familias y géneros específicos identificados en este proyecto, se pudo obtener para el caso de las salamandras negativas al hongo *Bd*, a *Elizabethkingia*, que presenta una función doble, dependiendo la condición en la que sea encontrada; por ejemplo, se ha visto que una alta abundancia de este género en la microbiota de ranas que han sido consideradas como resistentes a *Bd*, como *Lithobates catesbeianus* (rana toro) con infecciones cutáneas, lo que podría sugerir que este género bacteriano podría tener una función relevante en la resistencia a infecciones cutáneas como *Bd*. Aunque, en el caso de humanos este género está catalogado como patógeno oportunista (Yang *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2025; Ringø, 2024; Leisner *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2019; Dosi *et al.*, 2024; Kosiorek *et al.*, 2024; Tomic-Canic *et al.*, 2020; Hrestak *et al.*, 2022; De Wert *et al.*, 2020; Byrd *et al.*, 2018).

Se observó que cuando se trata de animales positivos a la infección por *Bd*, hay familias como la Microbacteraceae que ha sido identificada en perros con sarna. Además de observar en animales detectados con *Bd*, la presencia de varios géneros relacionados a infecciones, patógenos oportunistas o comensales tales como: *Aureimonas* y *Lautropia* (Yang *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2025; Ringø, 2024; Leisner *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2019; Dosi *et al.*, 2024; Kosiorek *et al.*, 2024; Tomic-Canic *et al.*, 2020; Hrestak *et al.*, 2022; De Wert *et al.*, 2020; Byrd *et al.*, 2018).

En este capítulo I, también se identificaron ciertas diferencias estructurales en las redes inferidas para el caso de las salamandras con infección y sin infección por *Bd*. En cuanto a las redes generales inferidas por condición, podemos ver las diferencias en las proporciones de Proteobacterias, Bacteroidota, Actinobacteriota y las diferencias que hay en la presencia de Firmicutes. Ambas estructuras presentan la formación de clústeres, que, aunque son de cantidad variable en cuanto a la condición, conservan las mismas propiedades en cuanto a las métricas de centralidad (intermediación, cercanía, coeficiente de clusterización, excentricidad y la conectividad que tienen los vecinos entre sí), en todos estos aspectos no se observaron cambios importantes. Incluso son muy parecidos en cuanto a los rangos de correlación y su fuerza (de 1 a 0.8). Lo que nos quiere decir es que cada uno de los clústeres formados tiene buena conectividad entre sí y posiblemente las funciones que requieren se encuentran en nodos dentro del mismo clúster, por lo tanto, no es necesaria una amplia conectividad al exterior de cada clúster. También indica que no hay como tal nodos *hubs* que sean de suma relevancia para mantener la funcionalidad o flujo de la información dentro de las estructuras. Las estructuras de cada red también difieren en cuanto a su composición, lo cual se pudo observar en los diagramas de Venn entre condiciones.

La modularidad aquí calculada es una medida que nos ayuda a cuantificar y evaluar la fuerza de la estructura de las comunidades, comparando la densidad de las conexiones dentro de cada módulo o comunidad de microorganismos. Se compararon las estructuras por condición y por género de salamandra, encontrando que la distribución, tamaño y composición de cada módulo son distintos entre especies de salamandras y entre condiciones de infección.

En cuanto a los valores de modularidad, son muy semejantes entre condiciones, no tienen tendencia a grandes variaciones; sin embargo, para el caso de *Eurycea* en la condición con *Bd*, se pudo observar un valor de 0 para la modularidad de la red, lo que nos dice que las comunidades bacterianas presentes no tienen una estructura comunitaria definida y que están distribuidas de manera uniforme o aleatoria y podría dar en consecuencia a una estructura comunitaria débil ante perturbaciones externas, como es el caso de la infección por *Bd*, así mismo, *Bd* podría estar causando esta perturbación, pero, solamente aplicaría para este tipo

de salamandra en específico. No hay evidencias de especialización funcional, debido a que no se encontraron valores de modularidad de 1, por lo que no hay módulos que realicen procesos específicos. Las demás redes presentaron una fuerte estructura comunitaria por tener valores mayores a 0.5. No se encontraron conexiones entre los módulos, lo que puede sugerir que no hay un flujo de información y nutrientes entre los grupos.

La modularidad también ha sido estudiada en otros contextos de comparación entre salud y enfermedad, encontrando que, en casos con pacientes o animales sanos; es más probable encontrar redes con una alta modularidad y que ésta característica puede tiende a ser sensible y reducirse con la presencia de patógenos como hongos o también por la presencia de enfermedades intestinales. Cuando existe una enfermedad o infección, los módulos tienen la tendencia a distorsionarse como se observó también en nuestros resultados (Belheouane *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2021; Kajihara & Hynson, 2024; Baldassano & Bassett, 2016; Fu *et al.*, 2025).

Cuando se realiza una comparación de componentes bacterianos presentes en módulos semejantes, es decir, módulos que fueron calculados en un mismo grupo (módulo), pero que son redes que pertenecen a una diferente condición (-/+); en teoría deberían ser los mismos componentes, en los mismos identificadores por color de cada módulo; sin embargo, se ha visto que los componentes compartidos entre cada grupo de condición tienen la tendencia a disminuir cuando se presentan infecciones o enfermedades; así como se observó también en nuestros resultados (Einarsson *et al.*, 2019; Ellis *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lloyd-Price *et al.*, 2016).

También se encontró que hay una mayor cantidad de correlaciones positivas en las salamandras sin infección por *Bd*, lo que podría hablarnos de que este tipo de redes pueden ser más susceptibles a las perturbaciones externas. En cambio, en la red de los animales positivos a *Bd*, se encontró una menor cantidad de correlaciones positivas, esto podría deberse a la infección por *Bd*, la cual genera cambios importantes en la estructura de la microbiota y podría estar favoreciendo las correlaciones negativas.

Las redes core inferidas mediante el método de Corduneanu *et al.*, 2023, construidas para cada condición mostraron diferencias en el número de componentes bacterianos presentes; hay una mayor cantidad de componentes en los animales sin *Bd* que en los animales que presentan la infección. Lo que nos habla de que la infección sí pudiera estar disminuyendo la presencia de microorganismos que son de importancia para la salud de las salamandras. La infección también podría estar afectando la fuerza de correlación de los componentes de la red core de los animales con la infección por *Bd*. Debido a que no se encontró el mismo número de conexiones ni la misma fuerza. Así mismo hay 5 nodos clave en la red core de los animales infectados, son aquellos que llevan el flujo de información en toda la red debido a que tienen el mayor número de conexiones, en el caso de la red core de animales no infectados, podemos observar que hay homogeneidad en el número de conexiones de todos los nodos.

Algunos de los géneros obtenidos en la red core de animales positivos a la infección por *Bd* como *Clostridium*, *Robinsoniella*, *Gordonibacter*, *Chitinovorax* y *Vampirovibrio* han sido identificados en la literatura como patógenos en distintos animales e incluso pueden ser géneros involucrados en infecciones presentes en humanos (Wei *et al.*, 2023; Bach *et al.*, 2021; Einarsson *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2013; Moroni *et al.*, 2025; Geese *et al.*, 2025; Baldassano & Bassett, 2016). Sobre todo, mencionar el caso específico del patógeno encontrado en este estudio: *Candidatus amphibiiichlamydia*, que es un patógeno que ha sido reportado en estudios recientes en anfibios, la cual ha sido catalogada como bacteria indicadora de salud en estos animales. Por lo tanto, su presencia en animales con infección detectada puede sugerir una sinergia entre microorganismos patógenos; o la reestructuración de la microbiota causada por un patógeno que ya colonizó el medio (Wei *et al.*, 2023; Bach *et al.*, 2021; Einarsson *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2013; Moroni *et al.*, 2025; Geese *et al.*, 2025; Baldassano & Bassett, 2016).

Estos resultados también concuerdan con estudios recientes, en donde se ha demostrado que la arquitectura funcional en animales o pacientes sanos es por lo regular más equilibrada y

fuerte (número de conexiones equitativo, conexiones con correlaciones altas); también se ha visto que los componentes pueden variar en salud y enfermedad, por lo regular se ha identificado una disminución de componentes bacterianos en animales o pacientes enfermos y sus redes biológicas o abundancias relativas suelen contener patógenos, oportunistas y/o bacterias comensales (Wei *et al.*, 2023; Bach *et al.*, 2021; Einarsson *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2013; Moroni *et al.*, 2025; Geese *et al.*, 2025; Baldassano & Bassett, 2016).

En cuanto a la robustez que presentan las redes, se hizo una comparación por condición y por especie de salamandra, para ver si se encontraron diferencias significativas. El análisis realizado entre animales susceptibles y tolerantes a la infección por *Bd* o *Bsal*, como se mencionó en los antecedentes, es notorio para la mayoría de los métodos de remoción de individuos (nodos) en la red. Los animales susceptibles tienen la tendencia de perder más rápido una mayor proporción de conectividad en toda la red y son susceptibles a perder nodos clave o centrales, que son aquellos que están comunicando a toda la red de microorganismos desde puntos centrales de la misma hasta la periferia. Esta comunicación permite llevar información, nutrientes, entre otras moléculas a toda la red para mantener su estructura y, en términos fisiológicos, mantener un estado saludable tanto en la piel del animal como entre las bacterias presentes, porque no habrá escasez de nutrientes, entre otros aspectos. Además se ha vuelto la red susceptible a perder nodos con un alto número de conexiones (*degree*), que son aquellos nodos que también están manteniendo una estructura importante en la red, mantener la comunicación de extremo a extremo de la misma y por lo general son integrantes importantes debido a que podrían estar cumpliendo funciones elementales que quizá algunos otros integrantes no tienen, por lo tanto mantener esas conexiones asegura la sobrevivencia de otros miembros dentro de la red en general o dentro de clústeres (pequeñas comunidades muy conectadas entre sí).

Finalmente, podrían ser más vulnerables a perder estas comunidades altamente conectadas entre sí; debido a que también se observó un alto porcentaje en la pérdida de conectividad total de la red para el método en cascada. Este método elimina un nodo y todos aquellos que estén conectados a ese mismo nodo. Por lo tanto, nodos o bacterias que podrían estar

formando clústeres desaparecerían con este método de remoción, lo cual, para los animales susceptibles, representaría un gran problema por su alto índice de modularidad visto (0.8). Con los resultados obtenidos se podría sugerir que los animales que presentan tolerancia a la infección por *Bd* o *Bsal*, presentan una mayor robustez en la red de microorganismos de su piel sin importar si la infección está presente o no en su piel. Además, esta resiliencia en la red de bacterias es independiente de la especie de salamandra, porque también se observó en la comparación de especies tolerantes, que se mantuvo una pérdida de conectividad aproximada del 75% para ambas salamandras *Eurycea* y *Desmognathus*. Algo que no se observó para el caso de los animales susceptibles, aunque presenten o no la infección.

En muchos otros casos de estudio sobre grupos sanos y enfermos, se ha trabajado con redes, se han analizado parámetros similares a los que en este proyecto se han medido y al igual que en este estudio, se han encontrado diferencias importantes en el arreglo estructural de las comunidades bacterianas, también se han encontrado diferencias en términos de resistencia y robustez entre las dos categorías de salud (Ruan *et al.*, 2015; Masoomy *et al.*, 2021). Además de que se han logrado encontrar marcadores bacterianos que definen diferencias entre una microbiota residente sana y una microbiota con disbiosis en hospederos enfermos (Zickenrott *et al.*, 2016; Masoomy *et al.*, 2021).

En cuanto al estudio de la vulnerabilidad estructural, los resultados obtenidos también presentan semejanzas con otros estudios recientes, como, por ejemplo, hace poco se observó en experimentos con ratones a los cuales les fue inducido algún tipo de cáncer, como es que su microbiota cambió en presencia de la enfermedad y perdió robustez, volviéndose la estructura de sus comunidades bacterianas, más vulnerables a factores externos como medicamentos y cambios físicos como pH o temperatura. Estas características también han sido vistas en otros modelos de estudio del microbioma como garrapatas infectadas con algún patógeno y en enfermedades intestinales inflamatorias (Abuin-Denis *et al.*, 2024; Wu-Chuang *et al.*, 2024; Röttjers & Faust, 2018; Xiao *et al.*, 2022; Maitre *et al.*, 2023; Geese *et al.*, 2025).

Las categorías de salud pueden mostrar todas las diferencias posibles entre sí: composición, estructura, robustez o modularidad (Baldassano & Bassett, 2016). Pero, también se ha visto, que pueden presentar sólo algunas diferencias puntuales, en alguna o algunas de las características mencionadas (Baldassano & Bassett, 2016). Este es un aspecto que aún requiere seguir siendo investigado.

Cada uno de los animales presentó un número diferente de bacterias patógenas identificadas en su piel, incluso entre animales de la misma especie se encontró una composición bacteriana diferente. Algunas de estas diferencias podrían deberse a la contaminación de diversas fuentes que podría ocurrir durante las distintas etapas del muestreo; también a las diferencias en la contaminación del hábitat de estas salamandras y a si su etapa final de desarrollo es acuática o terrestre. También depende de cuánta urbanización haya dentro de las localidades de muestreo, estos son el tipo de parámetros que no se pudieron controlar en este análisis.

Algunas de las bacterias que fueron identificadas en la piel de los animales estudiados, han sido reportadas como parte de la microbiota ambiental (Vaelli *et al.*, 2020; Jost *et al.*, 2025). Estas bacterias podrían estar asociadas a un comportamiento “oportunista” para adaptarse y colonizar superficies altamente expuestas al ambiente como las salamandras. La presencia de bacterias oportunistas encontradas en este estudio y que, se ha identificado en la literatura, están presentes en el ambiente (Sánchez *et al.*, 2017). Hay algunas salamandras que tienden a seleccionar y permitir la colonización de microorganismos que no son abundantes en el ambiente en el que viven. A veces estos sirven como primera barrera de defensa ayudando con la producción de toxinas (Vaelli *et al.*, 2020; Jost *et al.*, 2025). Es probable que en el caso de la salamandra *N. viridescens*, la presencia de ciertos patógenos oportunistas se deba a esta causa (Walke *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, se ha visto que los tratamientos antibióticos aplicados a los anfibios enfermos de *Bd* inducen cambios importantes en la microbiota intestinal de los animales. Sorprendentemente, no alteran totalmente la diversidad de microorganismos presentes en la piel. Estas variaciones demuestran que algunos tratamientos deben evaluarse en términos de

sus beneficios terapéuticos con respecto a los efectos secundarios que pueden causar (Long *et al.*, 2024). Los tratamientos con antibióticos pueden ser capaces de permitir la transmisión de genes de resistencia, provocando un mayor estado de disbiosis y deterioro de los microorganismos probióticos presentes (Lin *et al.*, 2022; Sinha *et al.*, 2021; Uddin *et al.*, 2021). Pero aún no se han visto o estudiado estos efectos para el caso de proteínas de tratamiento diseñadas. Por lo que podrían ser una gran alternativa para el tratamiento de cualquier tipo de infección.

Se ha estudiado que la disbiosis en la microbiota intestinal está relacionada con la ruptura de sinergias entre microorganismos, lo que puede iniciar o empeorar enfermedades en los animales (Long *et al.*, 2024). También se ha visto que, dentro de la disbiosis microbiana intestinal de los anfibios, existen algunos géneros bacterianos patógenos como *Aeromonas* y *Plesiomonas* que se relacionan con el aumento de lesiones e inflamación en animales como *Xenopus laevis*.

En humanos con presencia de colitis ulcerosa, se ha visto que la microbiota puede ser capaz de mejorar o puede empeorar la enfermedad y en consecuencia, aumentar el daño a la mucosa intestinal (Long *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2022). El aumento o la presencia de algunos géneros de patógenos en la microbiota puede aumentar el impacto de una enfermedad inicial. Sin embargo, estos estudios no se han realizado sobre el *Bd* y la presencia-impacto de bacterias oportunistas durante la infección, pero se sabe que el tratamiento de las enfermedades intestinales con antibióticos es capaz de alterar la microbiota cutánea (Becker *et al.*, 2021; Sinha *et al.*, 2021). También puede aumentar la susceptibilidad de los animales a las infecciones (Long *et al.*, 2024).

Además, recientemente se han probado terapias, como las terapias de calor en especies de anuros, lo que se ha estudiado que tiene efectos beneficiosos en las ranas que presentan infección, disminuyendo la carga de *Bd* y por lo tanto, disminuyendo los efectos adversos de la infección. Pero, este tipo de tratamiento no puede aplicarse a animales como las salamandras, que son mucho menos tolerantes a los cambios de temperatura (Spotila, 1972; Catenazzi, 2016; Markle & Kozak, 2018; Zhai *et al.*, 2025). Con el paso del tiempo, han surgido nuevos estudios en ranas tratadas con esta terapia, en los que se demuestra que la

disminución de carga fúngica no es permanente y vuelve a incrementar después de un par de meses (Kásler *et al.*, 2022; Holmes *et al.*, 2024).

Por lo tanto, contar con alternativas de tratamiento es importante, incluyendo la búsqueda, desarrollo y mejora de antimicrobianos por diseño, reduce los impactos no deseados del tratamiento, por lo que durante su construcción se trata de evitar y tener en cuenta cada aspecto. La presencia de algunos patógenos oportunistas, como el género *Acinetobacter* en ranas como *Paa spinosa*, aumenta su susceptibilidad a enfermedades causadas por patógenos (Xiang *et al.*, 2018). También hay pruebas de que los animales con una microbiota más alta compuesta por microorganismos oportunistas tienen un mayor riesgo de infecciones (Xiang *et al.*, 2018). Con esta parte del proyecto se propuso a una proteína capaz de inducir la reestructuración de las comunidades bacterianas en la piel, para que, posteriormente, las otras secciones de la proteína con efectos antifúngicos, puedan surtir efecto; este tipo de abordaje no se había realizado, pero si se había propuesto y probado con cepas genéticamente modificadas de *Serratia marcescens* y el compuesto que produce prodigiosina, mostró diferencias en la mortalidad del huésped ante la infección por *Bd*, debido a la reestructuración de la microbiota (Madison *et al.*, 2019).

Al igual que los resultados de este trabajo, también se han encontrado patógenos oportunistas en animales sanos (Ruengsomwong *et al.*, 2016), ratones (Zhang *et al.*, 2010). Por lo que no es extraño pensar que la presencia en bajas proporciones de microorganismos oportunistas no causa daño a los animales, porque se ha visto que mantienen un estado "saludable" o en equilibrio (Xiang *et al.*, 2018). Aunque el efecto sinérgico podría ser dependiente de las proporciones presentes en el microbiota, en algunos casos es suficiente con la presencia de ciertos géneros que por sí solos son capaces de inducir un efecto negativo en cascada (Salvatore *et al.*, 2022; Gibson *et al.*, 2021). Muchas de las bacterias que se clasifican como patógenos oportunistas, comensales o patógenos facultativos, en condiciones normales no son capaces de causar infecciones; sin embargo, son capaces de enfermar al huésped cuando el microambiente en los tejidos es adecuado para su desarrollo (Dey & Ray Chaudhuri, 2023).

Se ha estudiado que hay microorganismos que pueden favorecer la colonización y el desarrollo de patógenos (Fast *et al.* 2018; Dey y Ray Chaudhuri, 2023). Un ejemplo de ello

son las bacterias del género *Lactobacillus*, que se asocian regularmente a la salud intestinal y que, de hecho, forman parte de diferentes productos del mercado (Sherid *et al.* 2016; Dey y Ray Chaudhuri, 2023). Sin embargo, estas mismas bacterias también son capaces de generar bacteriemia en pacientes con abscesos hepáticos y que tienen una infección por *Clostridium difficile* y se recomienda la suplementación con *Lactobacillus* (Sherid *et al.* 2016; Dey y Ray Chaudhuri, 2023). La alta abundancia de esta bacteria también se ha asociado con pacientes con cáncer gástrico (Dey y Ray Chaudhuri, 2023).

Uno de los mecanismos que se ha estudiado hasta el momento es que el género *Lactobacillus* puede aumentar su crecimiento gastrointestinal debido a su tolerancia a ambientes con pH ácido, por lo que los pacientes que tengan problemas con las bombas de regulación del pH en el tejido gástrico serán propensos a infecciones por esta bacteria (Shin *et al.* 2016; Dey y Ray Chaudhuri, 2023). Se necesitan más estudios sobre la microbiota y sus interacciones en la piel de los anfibios, porque hasta ahora solo es posible hacer suposiciones sobre su comportamiento en estos animales y en animales enfermos de *Bd*.

La ausencia de enfermedades gastrointestinales se asocia con una buena alimentación, el control del estrés y la no exposición a productos químicos como los antibióticos (Dey y Ray Chaudhuri, 2023); en el caso de los anfibios, la mala alimentación, la contaminación de los cuerpos de agua y del suelo, el estrés continuo causado por estos contaminantes y el continuo calentamiento del planeta y posiblemente la mala alimentación, debido a que las fuentes de alimento de estos animales también pueden disminuir su cantidad o su calidad debido a los factores antes mencionados, es por eso que es probable que muchas de las bacterias oportunistas en la piel de los anfibios puedan causar infección en sinergia con *Bd*, pero se requieren más estudios al respecto.

El objetivo de crear tratamientos por métodos informáticos busca restablecer el equilibrio en la microbiota de los animales enfermos, debido a que la infección induce disbiosis y se ha perdido gran parte de las bacterias encargadas de mantener la salud y el sistema inmunitario (Assis *et al.*, 2023). Por lo que un tratamiento con múltiples dianas podría abordar esta problemática, además de brindar un camino de acción para la generación de otros

tratamientos en otras infecciones fúngicas, que actualmente van en aumento (Schilliger *et al.*, 2023).

En los capítulos II y III de este proyecto, se pudo obtener un diseño completo de una proteína con el potencial de mitigar el *Bd* y otros microorganismos patógenos que posiblemente podrían generar asociaciones sinérgicas con la infección. Esto se logró mediante la unión de varias secuencias diseñadas específicamente para cumplir ciertas funciones dentro de un mismo diseño.

En la actualidad, se han utilizado métodos *in silico* para desarrollar péptidos y proteínas con función antimicrobiana, y en muchos casos se ha podido mejorar la función de proteínas existentes en la naturaleza con funciones definidas en la literatura. Los programas utilizados aquí son los que han garantizado resultados fiables a lo largo del tiempo, ninguno de ellos deja de estar disponible para su uso y todos los enlaces para descargar o subir proyectos siguen estando en línea. Esto es importante porque muchos proyectos han utilizado software que ya no está disponible a pesar de estar documentado en artículos.

Los parámetros analizados en este proyecto, como el HemoPI, son de gran relevancia en la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de infecciones porque se debe asegurar que no exista función hemolítica, lo que podría poner en riesgo al individuo al que se administra por efectos secundarios imprevistos. El método de acoplamiento molecular es ampliamente utilizado no solo para el diseño de tratamientos específicos, sino también para la predicción de enzimas, el diseño de enzimas, el diseño o la mejora de las interacciones de metabolitos secundarios. Los valores obtenidos para HemoPI, ProtParam, BIOFIN, Antifp y CAMPr4 son similares a los de péptidos y proteínas cuya función antifúngica o antimicrobiana específica ya se ha documentado (Tijare *et al.*, 2025).

Este tipo de procedimiento también se puede aplicar al desarrollo de vacunas, porque se han obtenido resultados de interacción y acoplamiento proteína-proteína, lo que demuestra que esta metodología puede tener más aplicaciones dependiendo del enfoque integrado en el que se implemente. Al igual que en este caso, el diseño de tratamientos específicos que tengan en cuenta otras microbiotas, ya sean probióticas, oportunistas o patógenas, aún no ha sido

ampliamente estudiado ni reportado en artículos, pero cada vez hay más evidencias de que la microbiota está implicada en muchos procesos de salud y enfermedad, no solo en el ámbito de las enfermedades infecciosas, sino también en áreas como la salud mental, salud intestinal y en garantizar la eficacia de los tratamientos anticancerígenos sin efectos secundarios.

Todos los casos anteriores necesitan modular el crecimiento de microorganismos que tienen efectos negativos sobre la salud, estos patógenos pueden estar ya clasificados como patógenos o pueden no estar dentro de esa clasificación; por lo tanto, es importante buscar proteínas o diseñar proteínas que puedan tener múltiples dianas y que modulen el crecimiento o eliminen ciertos microorganismos que causan problemas al generar disbiosis en los huéspedes. Este tipo de metodología integral aquí propuesta tiene una amplia área de oportunidad, debido a que, podría mejorar los criterios para seleccionar los microorganismos patógenos y oportunistas que serán objeto de tratamiento.

También reconocemos que este estudio tiene algunas limitaciones en cuanto a las bases de datos utilizadas y el programa predictor de secuencia de microorganismos patógenos 16sPIP, que es una pequeña base de datos de solo 155 patógenos y la mayoría son patógenos que causan enfermedades en humanos y no en animales. Se utilizó esta lista, debido a que se necesitaba enfocar la detección a patógenos con posible actividad oportunista, es decir, patógenos que por momentos no están activos en sus factores de virulencia, pero que bajo las condiciones ideales si son capaces de producir enfermedad. Esta lista, debido a su tamaño, nos permitió obtener resultados delimitados en todas las muestras, lo que favoreció su análisis. La mayoría de los patógenos identificados son patógenos en humanos y aún no se han reportado como causa de infección en anfibios, sin embargo, ya se han documentado algunas bacterias, como *Mycobacterium gordonae*, que es un patógeno que infecta a humanos, causando enfermedad a *Xenopus tropicalis* (Sánchez-Morgado *et al.*, 2009).

Las pruebas que se pueden realizar en los modelos de proteínas diseñados han mejorado en los últimos años y se pueden realizar más pruebas. Sin embargo, siguen siendo limitados. A pesar de lo anterior, se obtuvo un resultado que, con las herramientas actuales disponibles, puede asegurar su interacción en membranas cargadas negativamente de microorganismos patógenos, además de que algunos de ellos tendrán una vida media bastante adecuada. La

secuencia y el modelo diseñados con función anti-*Bd* también tenían buenos parámetros para seguir su función. La importancia de este tipo de diseño radica en que las secuencias pueden ser mejoradas hasta obtener el resultado deseado a un bajo costo. Además, se puede obtener un gran número de nuevas moléculas con potencial antimicrobiano, lo que actualmente es importante con el aumento de la resistencia a los antibióticos. Las perspectivas de esta sección son la síntesis de proteínas y la realización de pruebas *in vitro* adicionales en los microorganismos clave mencionados en este proyecto. Además, con la tecnología ahora disponible, se podría garantizar un método eficiente de administración en animales silvestres y, por lo tanto, apoyar la conservación de estos animales.

Hasta el momento se tiene referencia de que los agentes patógenos *Bd* y *Bsal* han sido de las principales causas de extinción de ranas y salamandras en todo el mundo, también se sabe que la microbiota juega un papel principal en el proceso de la infección y en procesos de resistencia y en procesos de inmunidad en el huésped (Woodhams *et al.*, 2018). Así como que el aumentar la abundancia de bacterias beneficiosas en contra de la infección tiene resultados favorables por lo menos parcialmente (Harris *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2012). Sin embargo, en el caso de las salamandras, se ha visto que la presencia de bacterias beneficiosas para la resistencia al hongo patógeno es muy baja y principalmente al muestrear la microbiota de las salamandras en su ambiente natural, existe una mayor proporción de patógenos, bacterias comensales y oportunistas que promueven la colonización de *Bd* o *Bsal* y que incluso pueden ayudar a empeorar los efectos de la infección y aumentar su letalidad (Bletz *et al.*, 2018). También es claro que la respuesta inmune de estos anfibios a la infección no es suficiente y que incluso la inmunidad adquirida tampoco ha sido observada en estos animales (Stegen *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

El estudio del papel de la microbiota en los procesos de salud y enfermedad resulta fundamental, porque un número creciente de patologías —tanto infecciosas como no infecciosas— se encuentran asociadas a estados de disbiosis microbiana. Además, es ampliamente reconocido que la microbiota influye de manera directa en la eficacia, toxicidad y destino metabólico de múltiples fármacos, pudiendo actuar tanto en beneficio como en detrimento del hospedero. Si bien este campo ha tenido un desarrollo acelerado principalmente en el contexto de la salud humana, los resultados de este trabajo refuerzan la necesidad de extender estos enfoques a sistemas animales, particularmente a aquellos afectados por patógenos emergentes. Esto no sólo es relevante desde una perspectiva ecológica y de conservación, sino también desde una dimensión de salud pública, considerando el papel de los animales silvestres como reservorios, amplificadores o centinelas de enfermedades con potencial zoonótico.

Desde una perspectiva ecológica y de sistemas, el análisis de redes microbianas permitió comprender cómo la infección por *Bd* no necesariamente se traduce en cambios evidentes en la presencia de taxones a nivel de género, sino en modificaciones profundas en la estructura, organización y robustez de las interacciones microbianas. Los resultados muestran que estados de salud e infección pueden compartir componentes taxonómicos similares, pero diferir sustancialmente en términos de conectividad, modularidad y vulnerabilidad estructural. Este hallazgo subraya la importancia de analizar la microbiota como un sistema dinámico de interacciones y no únicamente como una lista de organismos presentes.

Si bien este trabajo aporta evidencia relevante y propone un marco metodológico integrador, también plantea nuevas preguntas. Es necesario profundizar en los efectos bioquímicos y funcionales que *Bd* ejerce sobre la microbiota residente, así como en el papel específico que desempeñan los distintos géneros bacterianos identificados dentro de la red microbiana. Asimismo, conforme las herramientas bioinformáticas continúen evolucionando, será

indispensable actualizar y refinar metodologías como la aquí propuesta, incorporando nuevos algoritmos, bases de datos más amplias y modelos predictivos más precisos.

En este contexto, el diseño *in silico* de nuevas estrategias terapéuticas emerge como una herramienta clave para enfrentar la velocidad con la que surgen patógenos emergentes. La posibilidad de integrar herramientas bioinformáticas de modelado estructural, predicción funcional y análisis de interacción proteína–proteína permite acelerar de manera significativa el desarrollo de nuevos fármacos, optimizar moléculas existentes y reducir tanto los costos como los tiempos asociados a las etapas iniciales de descubrimiento. Este enfoque resulta particularmente relevante frente a escenarios en los que los tiempos de respuesta tradicionales son claramente superados por la dinámica evolutiva de los patógenos.

Entre los principales aportes de este proyecto se encuentra la propuesta de un flujo metodológico reproducible y flexible para el diseño de proteínas terapéuticas, que integra el diseño racional de secuencias, el modelamiento estructural y una batería de pruebas *in silico* orientadas a evaluar propiedades clave como estabilidad, vida media, potencial antimicrobiano y afinidad por dianas moleculares específicas. Este enfoque permitió no solo evaluar la viabilidad estructural de los diseños propuestos, sino también priorizar candidatos con mayor potencial para su posterior síntesis y validación experimental.

Adicionalmente, se logró diseñar una proteína compuesta con múltiples dominios funcionales, capaz de interactuar con diversas dianas moleculares presentes tanto en el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* como en géneros bacterianos oportunistas asociados a la microbiota cutánea de salamandras. Este diseño multi-blanco representa una aproximación innovadora, al considerar explícitamente la complejidad del sistema hospedero–microbiota–patógeno y al proponer una estrategia terapéutica que no se limita a la eliminación directa del patógeno, sino que potencialmente podría contribuir a la reestructuración de comunidades microbianas alteradas.

En conjunto, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones orientadas al diseño racional de terapias multi-blanco y al entendimiento de la disbiosis como un fenómeno estructural y funcional. Sus implicaciones trascienden el caso particular de los anfibios y la

infección por *Bd*, y abren la posibilidad de aplicar enfoques similares en otros sistemas hospedero–patógeno, tanto en animales como en humanos, donde la microbiota juega un papel central en la salud, la enfermedad y la respuesta a tratamientos.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo abre múltiples líneas de investigación que pueden desarrollarse en el corto y mediano plazo. En primer lugar, resulta prioritario profundizar en el estudio comparativo de la microbiota cutánea en presencia y ausencia de infecciones por *Bd*, con el objetivo de caracterizar de manera más detallada el comportamiento de los géneros bacterianos bajo condiciones de estrés biológico. En este sentido, futuros estudios deberían incorporar análisis funcionales y moleculares que permitan evaluar si *Bd* interactúa de manera directa con otros microorganismos presentes en la piel del hospedero, o si dichas interacciones ocurren de forma indirecta a través de metabolitos secundarios, cambios en el microambiente o alteraciones en las redes de interacción microbiana.

Asimismo, será necesario ampliar el esfuerzo de muestreo, incorporando un mayor número de localidades y especies de anfibios, particularmente en regiones donde la presencia de *Bd* esté asociada a alta letalidad y declives poblacionales severos. Contar con datos espaciales y temporales más robustos permitirá evaluar con mayor precisión la variabilidad de la microbiota cutánea, identificar patrones de susceptibilidad o tolerancia a la infección y fortalecer los análisis de redes microbianas bajo distintos contextos ecológicos. De manera complementaria, mantener registros actualizados sobre la dispersión de *Bd* y su impacto en poblaciones silvestres contribuirá de forma directa a estrategias de monitoreo y conservación de anfibios.

Desde una perspectiva aplicada, el siguiente paso lógico de esta investigación es la síntesis y validación experimental de las proteínas diseñadas *in silico*. La evaluación de estas moléculas en condiciones controladas permitiría validar la metodología computacional empleada, así como determinar su estabilidad, toxicidad y eficacia antimicrobiana y antifúngica. Inicialmente, estas pruebas podrían realizarse en cultivos microbianos individuales y posteriormente en sistemas más complejos que incluyan consorcios bacterianos representativos de la microbiota cutánea, con el fin de evaluar efectos multi-blanco y posibles impactos sobre la estructura comunitaria.

Finalmente, será fundamental explorar estrategias de administración que consideren las particularidades fisiológicas y ecológicas de los anfibios. Factores como la permeabilidad de la piel, la persistencia de la molécula en ambientes acuáticos o terrestres, y las posibles interacciones con la microbiota residente deberán ser considerados para maximizar la eficacia del tratamiento y minimizar efectos no deseados. En conjunto, estas perspectivas no solo permitirán avanzar hacia la validación experimental de los resultados aquí presentados, sino que también sentarán las bases para el desarrollo de enfoques terapéuticos integrales orientados a la conservación de anfibios frente a patógenos emergentes.

REFERENCIAS

1. Abuin-Denis, L., Piloto-Sardiñas, E., Maître, A., Wu-Chuang, A., Mateos-Hernández, L., Obregon, D., Corona-González, B., Fogaça, A. C., Palinauskas, V., Aželytė, J., Rodríguez-Mallon, A., & Cabezas-Cruz, A. (2024). Exploring the impact of *Anaplasma phagocytophilum* on colonization resistance of *Ixodes scapularis* microbiota using network node manipulation. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 5, 100177. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2024.100177>
2. Agate, L., Beam, D., Bucci, C., Dukashin, Y., Jo'Beh, R., O'Brien, K., & Jude, B. A. (2016). The Search for Violacein-Producing Microbes to Combat *Batrachochytrium dendrobatidis*: A Collaborative Research Project between Secondary School and College Research Students. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 17(1), 70-73. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v17i1.1002>
3. Araújo, A. P. D. C., Rocha, T. L., E Silva, D. D. M., & Malafaia, G. (2021). Micro(nano)plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: A scientometric and systematic review. *Chemosphere*, 283, 131090. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131090>
4. Araya, J. P., González, M., Cardinale, M., Schnell, S., & Stoll, A. (2019). Microbiome Dynamics Associated With the Atacama Flowering Desert. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03160>
5. Assis, V. R., Robert, J., & Titon, S. C. M. (2023). Introduction to the special issue Amphibian immunity: Stress, disease and ecoimmunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1882), 20220117. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0117>
6. Bach, L. L., Ram, A., Ijaz, U. Z., Evans, T. J., & Lindström, J. (2021). A Longitudinal Study of the Human Oropharynx Microbiota Over Time Reveals a Common Core and Significant Variations With Self-Reported Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11, 573969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573969>

7. Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., & Lund Nielsen, J. (2016). The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, 2016, 5304028. <https://doi.org/10.1155/2016/5304028>
8. Baldassano, S. N., & Bassett, D. S. (2016). Topological distortion and reorganized modular structure of gut microbial co-occurrence networks in inflammatory bowel disease. *Scientific Reports*, 6(1), 26087. <https://doi.org/10.1038/srep26087>
9. Bartels, E. J. H., Dekker, D., & Amiche, M. (2019). Dermaseptins, Multifunctional Antimicrobial Peptides: A Review of Their Pharmacology, Effectivity, Mechanism of Action, and Possible Future Directions. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1421. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01421>
10. Basanta, M. D., Avila-Akerberg, V., Byrne, A. Q., Castellanos-Morales, G., González Martínez, T. M., Maldonado-López, Y., Rosenblum, E. B., Suazo-Ortuño, I., Parra Olea, G., & Rebollar, E. A. (2022). The fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* is not detected in wild and captive amphibians from Mexico. *PeerJ*, 10, e14117. <https://doi.org/10.7717/peerj.14117>
11. Basanta, M. D., Byrne, A. Q., Rosenblum, E. B., Piovio-Scott, J., & Parra-Olea, G. (2021). Early presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexico with a contemporary dominance of the global panzootic lineage. *Molecular Ecology*, 30(2), 424-437. <https://doi.org/10.1111/mec.15733>
12. Basanta, M. D., Rebollar, E. A., García-Castillo, M. G., Rosenblum, E. B., Byrne, A. Q., Piovio-Scott, J., & Parra-Olea, G. (2022). Genetic variation of *Batrachochytrium dendrobatidis* is linked to skin bacterial diversity in the Pacific treefrog *Hyliola regilla* (hypochondriaca). *Environmental Microbiology*, 24(1), 494-506. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15861>
13. Bates, K. A., Clare, F. C., O'Hanlon, S., Bosch, J., Brookes, L., Hopkins, K., McLaughlin, E. J., Daniel, O., Garner, T. W. J., Fisher, M. C., & Harrison, X. A. (2018). Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nature Communications*, 9(1), 693. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02967-w>

14. Bates, K. A., Sommer, U., Hopkins, K. P., Shelton, J. M. G., Wierzbicki, C., Sergeant, C., Tapley, B., Michaels, C. J., Schmeller, D. S., Loyau, A., Bosch, J., Viant, M. R., Harrison, X. A., Garner, T. W. J., & Fisher, M. C. (2022). Microbiome function predicts amphibian chytridiomycosis disease dynamics. *Microbiome*, 10(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01215-6>
15. Bauer, K. L., Steeil, J. C., Walsh, T. F., Evans, M. J., Klocke, B., Gratwicke, B., Siegal-Willott, J. L., & Neiffer, D. L. (2018). BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS IN A CAPTIVE COLLECTION OF GREEN SALAMANDERS (ANEIDES AENEUS), LONG-TAILED SALAMANDERS (EURYCEA LONGICAUDA), AND TWO-LINED SALAMANDERS (EURYCEA BISLINEATA). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(2), 454-459. <https://doi.org/10.1638/2017-0174.1>
16. Becker, M. H., Brophy, J. A. N., Barrett, K., Bronikowski, E., Evans, M., Glassey, E., Kaganer, A. W., Klocke, B., Lassiter, E., Meyer, A. J., Muletz-Wolz, C. R., Fleischer, R. C., Voigt, C. A., & Gratwicke, B. (2021). Genetically modifying skin microbe to produce violacein and augmenting microbiome did not defend Panamanian golden frogs from disease. *ISME Communications*, 1(1), 57. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00044-w>
17. Becker, M. H., Brucker, R. M., Schwantes, C. R., Harris, R. N., & Minbiole, K. P. C. (2009). The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6635-6638. <https://doi.org/10.1128/AEM.01294-09>
18. Becker, M. H., Walke, J. B., Cikanek, S., Savage, A. E., Mattheus, N., Santiago, C. N., Minbiole, K. P. C., Harris, R. N., Belden, L. K., & Gratwicke, B. (2015). Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20142881. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2881>
19. Belheouane, M., Vallier, M., Čepić, A., Chung, C. J., Ibrahim, S., & Baines, J. F. (2020). Assessing similarities and disparities in the skin microbiota between wild and

- laboratory populations of house mice. *The ISME Journal*, 14(10), 2367-2380. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0690-7>
20. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
 21. Berger, L., Speare, R., Pessier, A., Voyles, J., & Skerratt, L. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(3), 165-174. <https://doi.org/10.3354/dao02238>
 22. Bletz, M. C., Kelly, M., Sabino-Pinto, J., Bales, E., Van Praet, S., Bert, W., Boyen, F., Vences, M., Steinfartz, S., Pasmans, F., & Martel, A. (2018). Disruption of skin microbiota contributes to salamander disease. *Proceedings. Biological Sciences*, 285(1885), 20180758. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0758>
 23. Bletz, M. C., Myers, J., Woodhams, D. C., Rabemananjara, F. C. E., Rakotonirina, A., Weldon, C., Edmonds, D., Vences, M., & Harris, R. N. (2017a). Estimating Herd Immunity to Amphibian Chytridiomycosis in Madagascar Based on the Defensive Function of Amphibian Skin Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1751.
 24. Bletz, M. C., Perl, R. G. B., Bobowski, B. T., Japke, L. M., Tebbe, C. C., Dohrmann, A. B., Bhuju, S., Geffers, R., Jarek, M., & Vences, M. (2017b). Amphibian skin microbiota exhibits temporal variation in community structure but stability of predicted Bd-inhibitory function. *The ISME Journal*, 11(7), 1521-1534. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.41>
 25. Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3), 197-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x>
 26. Bosch, T. C. G., Blaser, M. J., Ruby, E., & McFall-Ngai, M. (2024). A new lexicon in the age of microbiome research. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1901), 20230060. <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0060>

27. Bourquin, M., Busi, S. B., Fodelianakis, S., Peter, H., Washburne, A., Kohler, T. J., Ezzat, L., Michoud, G., Wilmes, P., & Battin, T. J. (2022). The microbiome of cryospheric ecosystems. *Nature Communications*, *13*(1), 3087. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30816-4>
28. Bradley, P. W., Brawner, M. D., Raffel, T. R., Rohr, J. R., Olson, D. H., & Blaustein, A. R. (2019). Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *PLOS ONE*, *14*(9), e0222237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222237>
29. Brannelly, L. A., Webb, R. J., Hunter, D. A., Clemann, N., Howard, K., Skerratt, L. F., Berger, L., & Scheele, B. C. (2018). Non-declining amphibians can be important reservoir hosts for amphibian chytrid fungus. *Animal Conservation*, *21*(2), 91-101. <https://doi.org/10.1111/acv.12380>
30. Brown, D. D., & Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*, *306*(1), 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>
31. Brown, L. C., Bobo, W. V., Gall, C. A., Müller, D. J., & Bousman, C. A. (2023). Pharmacomicrobiomics of Antidepressants in Depression: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine*, *13*(7), 1086. <https://doi.org/10.3390/jpm13071086>
32. Byer, A. M., Nguyen, K. M., Katz, T. S., Chen, R., & Briggs, C. J. (2024). *Drosophila melanogaster* as a model arthropod carrier for the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLOS ONE*, *19*(7), e0307833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0307833>
33. Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(3), 143-155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
34. Campbell, L. J., Garner, T. W. J., Hopkins, K., Griffiths, A. G. F., & Harrison, X. A. (2019). Outbreaks of an Emerging Viral Disease Covary With Differences in the Composition of the Skin Microbiome of a Wild United Kingdom Amphibian. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01245>
35. Carniel, E. (2001). The high-pathogenicity island: An iron-uptake island. *Microbes and Infection*, *3*(7), 561-569. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01412-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01412-5)

36. Catenazzi, A. (2016). Ecological implications of metabolic compensation at low temperatures in salamanders. *PeerJ*, 4, e2072. <https://doi.org/10.7717/peerj.2072>
37. Chapman, P. A., Hudson, D., Morgan, X. C., & Beck, C. W. (2024). The role of family and environment in determining the skin bacterial communities of captive aquatic frogs, *Xenopus laevis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(11), fae131. <https://doi.org/10.1093/femsec/fae131>
38. Chau, R., Kalaitzis, J. A., & Neilan, B. A. (2011). On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic Toxicology*, 104(1-2), 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.001>
39. Chew, A., West, M., Berger, L., & Brannelly, L. A. (2024). The impacts of water quality on the amphibian chytrid fungal pathogen: A systematic review. *Environmental Microbiology Reports*, 16(3), e13274. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13274>
40. Clark, S., Jowitt, T. A., Harris, L. K., Knight, C. G., & Dobson, C. B. (2021). The lexicon of antimicrobial peptides: A complete set of arginine and tryptophan sequences. *Communications Biology*, 4(1), 605. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-7>
41. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, 148(6), 1258-1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
42. Clemons, R., Yacoub, M., Faust, E., Toledo, L. F., Jenkinson, T. S., Carvalho, T., Simmons, D. R., Kalinka, E., Fritz-Laylin, L. K., James, T. Y., & Stajich, J. E. (2023). *Discovery of an endogenous DNA virus in the amphibian killing fungus and its association with pathogen genotype and virulence.* <https://doi.org/10.1101/2023.03.16.532857>
43. Corben, C. J., Ingram, G. J., & Tyler, M. J. (1974). Gastric brooding: Unique form of parental care in an Australian frog. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4167), 946-947. <https://doi.org/10.1126/science.186.4167.946>
44. Cordeiro, I. F., Lemes, C. G. de C., Sanchez, A. B., da Silva, A. K., de Paula, C. H., de Matos, R. C., Ribeiro, D. F., de Matos, J. P., Garcia, C. C. M., Beirão, M., Becker,

- C. G., Pires, M. R. S., & Moreira, L. M. (2024). Amphibian tolerance to arsenic: Microbiome-mediated insights. *Scientific Reports*, *14*(1), 10193. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60879-w>
45. Corduneanu, A., Wu-Chuang, A., Maitre, A., Obregon, D., Sándor, A. D., & Cabezas-Cruz, A. (2023). Structural differences in the gut microbiome of bats using terrestrial vs. Aquatic feeding resources. *BMC Microbiology*, *23*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02836-7>
46. Costa, S., & Lopes, I. (2022). Saprolegniosis in Amphibians: An Integrated Overview of a Fluffy Killer Disease. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *8*(5), 537. <https://doi.org/10.3390/jof8050537>
47. Dambach, P. (2020). The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: Opportunities and limitations. *Biological Control*, *150*, 104357. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104357>
48. De Wert, L. A., Rensen, S. S., Soons, Z., Poeze, M., Bouvy, N. D., & Penders, J. (2020). The cutaneous microbiome in hospitalized patients with pressure ulcers. *Scientific Reports*, *10*(1), 5963. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62918-8>
49. Derovs, A., Laivacuma, S., & Krumina, A. (2019). Targeting Microbiota: ¿What Do We Know about It at Present? *Medicina*, *55*(8), 459. <https://doi.org/10.3390/medicina55080459>
50. Dey, P., & Ray Chaudhuri, S. (2023). The opportunistic nature of gut commensal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, *49*(6), 739-763. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2133987>
51. Di Gioia, D., Bozzi Cionci, N., Baffoni, L., Amoruso, A., Pane, M., Mogna, L., Gaggia, F., Lucenti, M. A., Bersano, E., Cantello, R., De Marchi, F., & Mazzini, L. (2020). A prospective longitudinal study on the microbiota composition in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Medicine*, *18*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01607-9>
52. Dosi, A., Meziti, A., Tounta, E., Koemtzopoulos, K., Komnenou, A., Dendrinou, P., & Kormas, K. (2024). Fecal and skin microbiota of two rescued Mediterranean monk

- seal pups during rehabilitation. *Microbiology Spectrum*, 12(1), e02805-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02805-23>
53. Dwaraka, V. B., & Voss, S. R. (2021). Towards comparative analyses of salamander limb regeneration. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 336(2), 129-144. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22902>
54. Einarsson, G. G., Zhao, J., LiPuma, J. J., Downey, D. G., Tunney, M. M., & Elborn, J. S. (2019). Community analysis and co-occurrence patterns in airway microbial communities during health and disease. *ERJ Open Research*, 5(3), 00128-02017. <https://doi.org/10.1183/23120541.00128-2017>
55. Ellis, R. J., Bruce, K. D., Jenkins, C., Stothard, J. R., Ajarova, L., Mugisha, L., & Viney, M. E. (2013). Comparison of the Distal Gut Microbiota from People and Animals in Africa. *PLoS ONE*, 8(1), e54783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054783>
56. Fast, D., Kostiuk, B., Foley, E., & Pukatzki, S. (2018). *Commensal-Pathogen Competition Impacts Host Viability*. <https://doi.org/10.1101/245324>
57. Fisher, M. C., Garner, T. W. J., & Walker, S. F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 291-310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>
58. Flechas, S. V., Sarmiento, C., Cárdenas, M. E., Medina, E. M., Restrepo, S., & Amézquita, A. (2012). Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PLoS ONE*, 7(9), e44832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044832>
59. Fonner, C., Patel, S., Boord, S., Venesky, M., & Woodley, S. (2017). Effects of corticosterone on infection and disease in salamanders exposed to the amphibian fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 123(2), 159-171. <https://doi.org/10.3354/dao03089>

60. Frerejacques, M., Rousselle, C., Gauthier, L., Cottet-Emard, S., Derobert, L., Roynette, A., Lerch, T. Z., & Changey, F. (2020). Human Skin Bacterial Community Response to Probiotic (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938) Introduction. *Microorganisms*, 8(8), 1223. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081223>
61. Fu, J., Yu, D., Zheng, W., Jiang, Y., Wang, L., Cai, H., Xia, Q., Shu, X.-O., & Xu, W. (2025). Topology of gut Microbiota Network and Guild-Based Analysis in Chinese Adults. *Phenomics*, 5(1), 91-108. <https://doi.org/10.1007/s43657-024-00211-8>
62. Gajewski, Z., Johnson, L. R., Medina, D., Crainer, W. W., Nagy, C. M., & Belden, L. K. (2023). Skin bacterial community differences among three species of co-occurring Ranid frogs. *PeerJ*, 11, e15556. <https://doi.org/10.7717/peerj.15556>
63. Galindo-Bustos, M. A., Hernandez-Jauregui, D. M. B., Cheng, T., Vredenburg, V., & Parra-Olea, G. (2014). PRESENCE AND PREVALENCE OF *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* IN COMMERCIAL AMPHIBIANS IN MEXICO CITY. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(4), 830-835. <https://doi.org/10.1638/2014-0023.1>
64. García, F. A., Fuentes, T. F., Alonso, I. P., Bosch, R. A., Brunetti, A. E., & Lopes, N. P. (2024). A Comprehensive Review of Patented Antimicrobial Peptides from Amphibian Anurans. *Journal of Natural Products*, 87(3), 600-616. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c01040>
65. García-Rodríguez, A., Basanta, M. D., García-Castillo, M. G., Zumbado-Ulate, H., Neam, K., Rovito, S., Searle, C. L., & Parra-Olea, G. (2022). Anticipating the potential impacts of *Batrachochytrium salamandrivorans* on Neotropical salamander diversity. *Biotropica*, 54(1), 157-169. <https://doi.org/10.1111/btp.13042>
66. Gass, J., & Voyles, J. (2022). When Defenses Fail: *Atelopus zeteki* Skin Secretions Increase Growth of the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Integrative and Comparative Biology*, 62(6), 1595-1605. <https://doi.org/10.1093/icb/icac060>
67. Geese, T., Bang, C., Franke, A., Lieb, W., & Dempfle, A. (2025). The human gut microbiota in IBD, characterizing hubs, the core microbiota and terminal nodes: A

- network-based approach. *BMC Microbiology*, 25(1), 371. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04106-0>
68. Gervasi, S. S., Urbina, J., Hua, J., Chestnut, T., A. Relyea, R., & R. Blaustein, A. (2013). Experimental Evidence for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Susceptibility to Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*, 10(2), 166-171. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0832-8>
69. Gibson, J. F., Pidwill, G. R., Carnell, O. T., Surewaard, B. G. J., Shamarina, D., Sutton, J. A. F., Jeffery, C., Derré-Bobillot, A., Archambaud, C., Siggins, M. K., Pollitt, E. J. G., Johnston, S. A., Serror, P., Sriskandan, S., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). Commensal bacteria augment *Staphylococcus aureus* infection by inactivation of phagocyte-derived reactive oxygen species. *PLoS Pathogens*, 17(9), e1009880. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009880>
70. Gowen, R., Gamal, A., Di Martino, L., McCormick, T. S., & Ghannoum, M. A. (2023). Modulating the Microbiome for Crohn's Disease Treatment. *Gastroenterology*, 164(5), 828-840. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.01.017>
71. Gupta, V. K., Kim, M., Bakshi, U., Cunningham, K. Y., Davis, J. M., Lazaridis, K. N., Nelson, H., Chia, N., & Sung, J. (2020). A predictive index for health status using species-level gut microbiome profiling. *Nature Communications*, 11(1), 4635. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18476-8>
72. Hardman, R. H., Reinert, L. K., Irwin, K. J., Oziminski, K., Rollins-Smith, L., & Miller, D. L. (2023). Disease state associated with chronic toe lesions in hellbenders may alter anti-chytrid skin defenses. *Scientific Reports*, 13(1), 1982. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28334-4>
73. Hardy, B., Pope, K., Piovio-Scott, J., Brown, R., & Foley, J. (2015). Itraconazole treatment reduces *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and increases overwinter field survival in juvenile Cascades frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(3), 243-250. <https://doi.org/10.3354/dao02813>
74. Harris, R. N., Brucker, R. M., Walke, J. B., Becker, M. H., Schwantes, C. R., Flaherty, D. C., Lam, B. A., Woodhams, D. C., Briggs, C. J., Vredenburg, V. T., & Minbiole, K. P. C. (2009). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a

- lethal skin fungus. *The ISME Journal*, 3(7), 818-824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>
75. Harris, R., Lauer, A., Simon, M., Banning, J., & Alford, R. (2009). Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83, 11-16. <https://doi.org/10.3354/dao02004>
76. Harrison, X. A., Price, S. J., Hopkins, K., Leung, W. T. M., Sergeant, C., & Garner, T. W. J. (2019). Diversity-Stability Dynamics of the Amphibian Skin Microbiome and Susceptibility to a Lethal Viral Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02883>
77. Hettyey, A., Ujszegi, J., Herczeg, D., Holly, D., Vörös, J., Schmidt, B. R., & Bosch, J. (2019). Mitigating Disease Impacts in Amphibian Populations: Capitalizing on the Thermal Optimum Mismatch Between a Pathogen and Its Host. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 254. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00254>
78. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., ... Urban, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(8), 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
79. Holmes, M. L., Shine, R., & Waddle, A. W. (2024). Spontaneous reoccurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in Australian green tree frogs (*Litoria caerulea*) following apparently successful heat therapy: Case report. *Veterinary Research Communications*, 48(5), 3229-3237. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10449-2>
80. Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>

81. Hoyt, J. R., Langwig, K. E., White, J. P., Kaarakka, H. M., Redell, J. A., Parise, K. L., Frick, W. F., Foster, J. T., & Kilpatrick, A. M. (2019). Field trial of a probiotic bacteria to protect bats from white-nose syndrome. *Scientific Reports*, 9(1), 9158. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45453-z>
82. Hrestak, D., Matijašić, M., Čipčić Paljetak, H., Ledić Drvar, D., Ljubojević Hadžavdić, S., & Perić, M. (2022). Skin Microbiota in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3503. <https://doi.org/10.3390/ijms23073503>
83. Hu, H.-L., Chen, J.-M., Chen, J.-Y., Seah, R. W. X., & Ding, G.-H. (2022). Microbial Diversity of the Chinese Tiger Frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) on Healthy versus Ulcerated Skin. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(10), 1241. <https://doi.org/10.3390/ani12101241>
84. Ivanov, I. I., & Honda, K. (2012). Intestinal Commensal Microbes as Immune Modulators. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 496-508. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.009>
85. Jani, A. J., Bushell, J., Arisdakessian, C. G., Belcaid, M., Boiano, D. M., Brown, C., & Knapp, R. A. (2021). The amphibian microbiome exhibits poor resilience following pathogen-induced disturbance. *The ISME Journal*, 15(6), 1628-1640. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00875-w>
86. Jiang, B., Zhang, W., Deng, N., Li, G., Ren, C., Sun, F., Wang, X., Xi, S., & Wei, S. (2025a). A systematic review of reported symptomatic *Elizabethkingia* infection cases in children and adults. *Acta Tropica*, 263, 107544. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107544>
87. Jiang, S., Huang, S., Zhang, Z., Ma, W., Han, Z., Song, Y., Huo, D., Cui, W., & Zhang, J. (2025b). Gut microbiota drives structural variation of exogenous probiotics to enhance colonization. *Gut Microbes*, 17(1), 2503371. <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2503371>
88. Jiménez, R. R., Alvarado, G., Estrella, J., & Sommer, S. (2019). Moving Beyond the Host: Unraveling the Skin Microbiome of Endangered Costa Rican Amphibians. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02060>

89. Jiménez, R. R., Carfagno, A., Linhoff, L., Gratwicke, B., Woodhams, D. C., Chafran, L. S., Bletz, M. C., Bishop, B., & Muletz-Wolz, C. R. (2022). Inhibitory Bacterial Diversity and Mucosome Function Differentiate Susceptibility of Appalachian Salamanders to Chytrid Fungal Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(8), e0181821. <https://doi.org/10.1128/aem.01818-21>
90. Johnson, M. L., & Speare, R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 915-921. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030145>
91. Johnson, M., Berger, L., Philips, L., & Speare, R. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, 255-260. <https://doi.org/10.3354/dao057255>
92. Jost, T., Henderson, A., LaBumbard, B., Magori, K., Stokes, A., Bergin, D., Holley, A., Bletz, M., Hernández-Gómez, O., Bucciarelli, G., Woodhams, D. C., Piovias Scott, J., & Walke, J. B. (2025). Tetrodotoxin, fungal pathogen infection, and bacterial microbiome associations are variable in the skin microecosystems of two *Taricha* newt species. *Frontiers in Amphibian and Reptile Science*, 2, 1503056. <https://doi.org/10.3389/famrs.2024.1503056>
93. K Redhu, A., Shah, A. H., & Prasad, R. (2016). MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance. *FEMS Yeast Research*, 16(4), fow043. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow043>
94. Kajihara, K. T., & Hynson, N. A. (2024). Networks as tools for defining emergent properties of microbiomes and their stability. *Microbiome*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01868-z>
95. Kásler, A., Ujszegi, J., Herczeg, D., Holly, D., Mikó, Z., & Hettyey, A. (2025). Heated Aquatic Shelters Reduce Infection Intensity but Not Prevalence of a Fungal Pathogen in Common Toad Tadpoles. *Animal Conservation*, 28(6), 844-853. <https://doi.org/10.1111/acv.70012>

96. Kásler, A., Ujszegi, J., Holly, D., Jaloveczki, B., Gál, Z., & Hettyey, A. (2022). In vitro thermal tolerance of a hypervirulent lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*: Growth arrestment by elevated temperature and recovery following thermal treatment. *Mycologia*, *114*(4), 661-669. <https://doi.org/10.1080/00275514.2022.2065443>
97. Kearns, P. J., Fischer, S., Fernández-Beaskoetxea, S., Gabor, C. R., Bosch, J., Bowen, J. L., Tlustý, M. F., & Woodhams, D. C. (2017). Fight Fungi with Fungi: Antifungal Properties of the Amphibian Mycobiome. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02494>
98. Kers, J. G., & Saccenti, E. (2022). The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 796025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796025>
99. Khosravi, A., & Mazmanian, S. K. (2013). Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(2), 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.009>
100. Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J., & Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: An emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011>
101. Kini, R. M., & Koh, C. Y. (2020). Snake venom three-finger toxins and their potential in drug development targeting cardiovascular diseases. *Biochemical Pharmacology*, *181*, 114105. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114105>
102. Knapp, R. A., Joseph, M. B., Smith, T. C., Hegeman, E. E., Vredenburg, V. T., Erdman Jr, J. E., Boiano, D. M., Jani, A. J., & Briggs, C. J. (2022). Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. *PeerJ*, *10*, e12712. <https://doi.org/10.7717/peerj.12712>
103. Kolby, J. E., Ramirez, S. D., Berger, L., Richards-Hrdlicka, K. L., Jocque, M., & Skerratt, L. F. (2015). Terrestrial Dispersal and Potential Environmental Transmission of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *PLOS ONE*, *10*(4), e0125386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125386>

104. Kosiorek, K., Grzesiak, J., Gawor, J., Sałańska, A., & Aleksandrzak-Piekarczyk, T. (2024). Polar-Region Soils as Novel Reservoir of Lactic Acid Bacteria from the Genus *Carnobacterium*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9444. <https://doi.org/10.3390/ijms25179444>
105. Kriger, K. M., & Hero, J. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, 13(6), 781-788. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00394.x>
106. Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2014). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular Ecology*, 23(6), 1238-1250. <https://doi.org/10.1111/mec.12510>
107. Küng, D., Bigler, L., Davis, L. R., Gratwicke, B., Griffith, E., & Woodhams, D. C. (2014). Stability of Microbiota Facilitated by Host Immune Regulation: Informing Probiotic Strategies to Manage Amphibian Disease. *PLoS ONE*, 9(1), e87101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087101>
108. Kuznetzova, O. Ju., Gorshenina, A. P., Nesterov, O. V., & Maximovskaya, L. N. (2017). Complex treatment of recurrent herpetic stomatitis with dysbiosis. *Stomatologiya*, 96(5), 31. <https://doi.org/10.17116/stomat201796531-33>
109. Lam, B. A., Walton, D. B., & Harris, R. N. (2011). Motile Zoospores of *Batrachochytrium dendrobatidis* Move Away from Antifungal Metabolites Produced by Amphibian Skin Bacteria. *EcoHealth*, 8(1), 36-45. <https://doi.org/10.1007/s10393-011-0689-7>
110. Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 592-613. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x>
111. Lemieux-Labonté, V., Dorville, N. A. S.-Y., Willis, C. K. R., & Lapointe, F.-J. (2020). Antifungal Potential of the Skin Microbiota of Hibernating Big Brown Bats

- (*Eptesicus fuscus*) Infected With the Causal Agent of White-Nose Syndrome. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01776>
112. Li, J., Delgado-Baquerizo, M., Wang, J.-T., Hu, H.-W., Cai, Z.-J., Zhu, Y.-N., & Singh, B. K. (2019b). Fungal richness contributes to multifunctionality in boreal forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107526. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107526>
113. Li, K., Bihan, M., & Methé, B. A. (2013). Analyses of the Stability and Core Taxonomic Memberships of the Human Microbiome. *PLoS ONE*, 8(5), e63139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063139>
114. Li, P., Zhang, J., Wang, S., Zhang, P., Chen, W., Ding, S., & Xi, J. (2022). Changes in the Distribution Preference of Soil Microbial Communities During Secondary Succession in a Temperate Mountain Forest. *Frontiers in Microbiology*, 13, 923346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.923346>
115. Li, S., Wang, X., Lu, Y., Wang, J., Yu, D., Zhou, Z., Wei, J., Liu, L., Liu, J., Liu, F., Su, Y., & Xu, H. (2023). Co-infections of *Klebsiella pneumoniae* and *Elizabethkingia miricola* in black-spotted frogs (*Pelophylax nigromaculatus*). *Microbial Pathogenesis*, 180, 106150. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106150>
116. Li, Z., Li, A., Dai, W., Leng, H., Liu, S., Jin, L., Sun, K., & Feng, J. (2022). Skin Microbiota Variation Among Bat Species in China and Their Potential Defense Against Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, 808788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.808788>
117. Li, Z., Wang, G., Zhang, K., Gong, W., Yu, E., Tian, J., Xie, J., & Yu, D. (2019a). Epizootic ulcerative syndrome causes cutaneous dysbacteriosis in hybrid snakehead (*Channa maculata*♀ × *Channa argus*♂). *PeerJ*, 7, e6674. <https://doi.org/10.7717/peerj.6674>
118. Lin, J.-N., Lai, C.-H., Yang, C.-H., & Huang, Y.-H. (2019). *Elizabethkingia* Infections in Humans: From Genomics to Clinics. *Microorganisms*, 7(9), 295. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090295>

119. Lin, X., Xu, Y., Han, R., Luo, W., & Zheng, L. (2022). Migration of antibiotic resistance genes and evolution of flora structure in the *Xenopus tropicalis* intestinal tract with combined exposure to roxithromycin and oxytetracycline. *Science of The Total Environment*, 820, 153176. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153176>
120. Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
121. Long, X., Dong, W., Xu, M., Han, X., Han, X., Cui, L., & Tong, Q. (2024). Impact of antibiotic therapy on cutaneous and gut microbiota in *Rana dybowskii* amphibians: Insights and implications. *Aquaculture*, 588, 740866. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740866>
122. Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). Batrachochytrium dendrobatidis gen. Et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219-227. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061011>
123. Lorch, J. M., Knowles, S., Lankton, J. S., Michell, K., Edwards, J. L., Kapfer, J. M., Staffen, R. A., Wild, E. R., Schmidt, K. Z., Ballmann, A. E., Blodgett, D., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., Last, L. A., Price, S. J., Schuler, K. L., Smith, C. E., Wellehan, J. F. X., & Blehert, D. S. (2016). Snake fungal disease: An emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1709), 20150457. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0457>
124. Loudon, A. H., Woodhams, D. C., Parfrey, L. W., Archer, H., Knight, R., McKenzie, V., & Harris, R. N. (2014). Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *The ISME Journal*, 8(4), 830-840.
125. Lu, Z. (2020). Microbiota Research: From History to Advances. *E3S Web of Conferences*, 145, 01014. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014501014>
126. Ma, Z. (Sam), Li, L., & Gotelli, N. J. (2019). Diversity-disease relationships and shared species analyses for human microbiome-associated diseases. *The ISME Journal*, 13(8), 1911-1919. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0395-y>

127. Madison, J. D., Berg, E. A., Abarca, J. G., Whitfield, S. M., Gorbatenko, O., Pinto, A., & Kerby, J. L. (2017). Characterization of *Batrachochytrium dendrobatidis* Inhibiting Bacteria from Amphibian Populations in Costa Rica. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00290>
128. Madison, J. D., Ouellette, S. P., Schmidt, E. L., & Kerby, J. L. (2019). *Serratia marcescens* shapes cutaneous bacterial communities and influences survival of an amphibian host. *Proceedings. Biological Sciences*, 286(1914), 20191833. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1833>
129. Maitre, A., Wu-Chuang, A., Mateos-Hernández, L., Piloto-Sardiñas, E., Foucault-Simonin, A., Cicculi, V., Moutailler, S., Paoli, J., Falchi, A., Obregón, D., & Cabezas-Cruz, A. (2023). Rickettsial pathogens drive microbiota assembly in *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus bursa* ticks. *Molecular Ecology*, 32(16), 4660-4676. <https://doi.org/10.1111/mec.17058>
130. Markle, T. M., & Kozak, K. H. (2018). Low acclimation capacity of narrow-ranging thermal specialists exposes susceptibility to global climate change. *Ecology and Evolution*, 8(9), 4644-4656. <https://doi.org/10.1002/ece3.4006>
131. Martel, A., Adriaensen, C., Sharifian-Fard, M., Vandewoestyne, M., Deforce, D., Favoreel, H., Bergen, K., Spitzen-van Der Sluijs, A., Devisscher, S., Adriaens, T., Louette, G., Baert, K., Hyatt, A., Cramer, S., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2013). The novel ‘Candidatus Amphibiichlamydia ranarum’ is highly prevalent in invasive exotic bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 105-108. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00359.x>
132. Martel, A., Spitzen-van Der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., & Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. Nov. Causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325-15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
133. Martínez-Ugalde, E., Ávila-Akerberg, V., González Martínez, T. M., Vázquez Trejo, M., Zavala Hernández, D., Anaya-Morales, S. L., & Rebollar, E. A. (2022). The skin microbiota of the axolotl *Ambystoma altamirani* is highly influenced by

- metamorphosis and seasonality but not by pathogen infection. *Animal Microbiome*, 4(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00215-7>
134. Masoomy, H., Askari, B., Tajik, S., Rizi, A. K., & Jafari, G. R. (2021). Topological analysis of interaction patterns in cancer-specific gene regulatory network: Persistent homology approach. *Scientific Reports*, 11(1), 16414. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94847-5>
135. Machado, M. S., Lauber, M., Reitmeier, S., Kacprowski, T., Baumbach, J., Haller, D., & List, M. (2021). Network analysis methods for studying microbial communities: A mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2687-2698. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>
136. Mathwin, R., Wassens, S., Young, J., Ye, Q., & Bradshaw, C. J. A. (2021). Manipulating water for amphibian conservation. *Conservation Biology*, 35(1), 24-34. <https://doi.org/10.1111/cobi.13501>
137. McArthur, D. B. (2019). Emerging Infectious Diseases. *The Nursing Clinics of North America*, 54(2), 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>
138. McDonald, C. A., Longo, A. V., Lips, K. R., & Zamudio, K. R. (2020). Incapacitating effects of fungal coinfection in a novel pathogen system. *Molecular Ecology*, 29(17), 3173-3186. <https://doi.org/10.1111/mec.15452>
139. McMahon, T. A., Brannelly, L. A., Chatfield, M. W. H., Johnson, P. T. J., Joseph, M. B., McKenzie, V. J., Richards-Zawacki, C. L., Venesky, M. D., & Rohr, J. R. (2013). Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 210-215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200592110>
140. McMillan, K. A. M., & Coombs, M. R. P. (2020). Review: Examining the Natural Role of Amphibian Antimicrobial Peptide Magainin. *Molecules*, 25(22), 5436. <https://doi.org/10.3390/molecules25225436>
141. Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(1), 238-248.

142. Miao, J., Han, N., Qiang, Y., Zhang, T., Li, X., & Zhang, W. (2017). 16SPIP: A comprehensive analysis pipeline for rapid pathogen detection in clinical samples based on 16S metagenomic sequencing. *BMC Bioinformatics*, *18*(S16), 568. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1975-3>
143. Moroni, F., Naya-Català, F., Hafez, A. I., Domingo-Bretón, R., Soriano, B., Llorens, C., & Pérez-Sánchez, J. (2025). Beyond Microbial Variability: Disclosing the Functional Redundancy of the Core Gut Microbiota of Farmed Gilthead Sea Bream from a Bayesian Network Perspective. *Microorganisms*, *13*(1), 198. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010198>
144. Moss, A. S., Reddy, N. S., Dortaj, I. M., & San Francisco, M. J. (2008). Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. *Mycologia*, *100*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1080/15572536.2008.11832493>
145. Mulder, K. P., Savage, A. E., Gratwicke, B., Longcore, J. E., Bronikowski, E., Evans, M., Longo, A. V., Kurata, N. P., Walsh, T., Pasmans, F., McInerney, N., Murray, S., Martel, A., & Fleischer, R. C. (2024). Sequence capture identifies fastidious chytrid fungi directly from host tissue. *Fungal Genetics and Biology*, *170*, 103858. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103858>
146. Muletz, C. R., Myers, J. M., Domangue, R. J., Herrick, J. B., & Harris, R. N. (2012). Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*, *152*, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.022>
147. Mutnale, M. C., Reddy, G. S., & Vasudevan, K. (2021). Bacterial Community in the Skin Microbiome of Frogs in a Coldspot of Chytridiomycosis Infection. *Microbial Ecology*, *82*(2), 554-558. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01669-5>
148. Myers, J. M., Ramsey, J. P., Blackman, A. L., Nichols, A. E., Minbiole, K. P. C., & Harris, R. N. (2012). Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The combined effect of symbiotic bacterial

- metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(8), 958-965. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0170-2>
149. Nava-González, B., Suazo-Ortuño, I., López, P. B., Maldonado-López, Y., Lopez-Toledo, L., Raggi, L., Parra-Olea, G., Alvarado-Díaz, J., & Gómez-Gil, B. (2021). Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection by Skin Bacterial Communities in Wild Amphibian Populations. *Microbial Ecology*, 82(3), 666-676. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01706-x>
150. Neely, W. J., Martins, R. A., Mendonça Da Silva, C. M., Ferreira Da Silva, T., Fleck, L. E., Whetstone, R. D., Woodhams, D. C., Cook, W. H., Prist, P. R., Valiati, V. H., Greenspan, S. E., Tozetti, A. M., Earley, R. L., & Becker, C. G. (2023). Linking microbiome and stress hormone responses in wild tropical treefrogs across continuous and fragmented forests. *Communications Biology*, 6(1), 1261. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05600-9>
151. Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltzer, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 973-980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
152. Ng, Q., Lim, Y., Yaow, C., Ng, W., Thumboo, J., & Liew, T. (2023). Effect of Probiotic Supplementation on Gut Microbiota in Patients with Major Depressive Disorders: A Systematic Review. *Nutrients*, 15(6), 1351. <https://doi.org/10.3390/nu15061351>
153. Nichols, D. K., Lamirande, E. W., Pessier, A. P., & Longcore, J. E. (2001). EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF CUTANEOUS CHYTRIDIOMYCOSIS IN DENDROBATID FROGS. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 1-11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.1>
154. Niederle, M. V., Bosch, J., Ale, C. E., Nader-Macias, M. E., Aristimuño Ficoseco, C., Toledo, L. F., Valenzuela-Sánchez, A., Soto-Azat, C., & Pasteris, S. E.

- (2019). Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLOS ONE*, 14(9), e0223020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223020>
155. Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLOS Pathogens*, 17(4), e1009503. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
156. Novotny, L., Powers, C. M., Royal, S. M., Preston, A. K., Hendrix, G. K., & Sola, M. F. (2024). Chytridiomycosis in a colony of hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 36(4), 303-309. <https://doi.org/10.1002/aah.10231>
157. O, E. T. (2025). Amphibian-Derived Antimicrobial Peptides: Essential Components of Innate Immunity and Potential Leads for New Antibiotic Development. *Protein & Peptide Letters*, 32(2), 97-110. <https://doi.org/10.2174/0109298665356946241218103145>
158. O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T. A., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K. A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., ... Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621-627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
159. Oh, W. T., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kim, S. W., Kang, J. W., Han, S. J., Kwon, J., Jun, J. W., & Park, S. C. (2019). *Janthinobacterium lividum* as An Emerging Pathogenic Bacterium Affecting Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fisheries in Korea. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 146. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030146>
160. Olson, D. H., Grant, E. H. C., Bletz, M., Piovia-Scott, J., Lesbarrères, D., Kerby, J. L., Adams, M. J., Breitman, M. F., Christman, M. R., Forzán, M. J., Gray, M. J., Hill, A. J., Koo, M. S., Milenkaya, O., Rebollar, E. A., Rollins-Smith, L. A., Serr, M., Shepack, A., Shirose, L., ... Mosher, B. A. (2024). Preparing for a Bsal

invasion into North America has improved multi-sector readiness. *Frontiers in Amphibian and Reptile Science*, 2, 1347541. <https://doi.org/10.3389/famrs.2024.1347541>

161. Olson, D. H., Ronnenberg, K. L., Glidden, C. K., Christiansen, K. R., & Blaustein, A. R. (2021). Global Patterns of the Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Support Conservation Urgency. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 685877. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.685877>
162. Origi, F. C., Pisano, S. R. R., Glaizot, O., Hertwig, S. T., Schmitz, A., & Ursenbacher, S. (2022). *Ophiodimyces ophiodiicola*, Etiologic Agent of Snake Fungal Disease, in Europe since Late 1950s. *Emerging Infectious Diseases*, 28(10), 2064-2068. <https://doi.org/10.3201/eid2810.220564>
163. Osborne, O. G., Jiménez, R. R., Byrne, A. Q., Gratwicke, B., Ellison, A., & Muletz-Wolz, C. R. (2024). Phyllosymbiosis shapes skin bacterial communities and pathogen-protective function in Appalachian salamanders. *The ISME Journal*, 18(1), wrae104. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae104>
164. Ossiboff, R. J., Towe, A. E., Brown, M. A., Longo, A. V., Lips, K. R., Miller, D. L., Carter, E. D., Gray, M. J., & Frasca, S. (2019). Differentiating *Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivorans* in Amphibian Chytridiomycosis Using RNAScope® in situ Hybridization. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 304. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00304>
165. Pabijan, M., Palomar, G., Antunes, B., Antoń, W., Zieliński, P., & Babik, W. (2020). Evolutionary principles guiding amphibian conservation. *Evolutionary Applications*, 13(5), 857-878. <https://doi.org/10.1111/eva.12940>
166. Pacheco, H. R., Reynoso, J. R., Tenneti, M. M., Rodriguez, K. M., & Voyles, J. (2024). The complement system and its involvement in inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a lethal fungal pathogen of amphibians. *Frontiers in Amphibian and Reptile Science*, 2, 1294491. <https://doi.org/10.3389/famrs.2024.1294491>

167. Paetzold, B., Willis, J. R., Pereira De Lima, J., Knödlseeder, N., Brüggemann, H., Quist, S. R., Gabaldón, T., & Güell, M. (2019). Skin microbiome modulation induced by probiotic solutions. *Microbiome*, 7(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0709-3>
168. Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 1-34. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.1-34.1998>
169. Parra Olea, G. (2021). BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS OCCURRENCE IN DEAD AMPHIBIANS OF CENTRAL MEXICO: A REPORT OF *Ambystoma altamirani* AND *Lithobates montezumae*. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 4(1), 173. <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2021.1.209>
170. Patocka, J., Nepovimova, E., Klimova, B., Wu, Q., & Kuca, K. (2019). Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 26(32), 5924-5946. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180713125314>
171. Pereira, K. E., & Woodley, S. K. (2021). Skin defenses of North American salamanders against a deadly salamander fungus. *Animal Conservation*, 24(4), 552-567. <https://doi.org/10.1111/acv.12666>
172. Pereira, K. E., Bletz, M. C., McCartney, J. A., Woodhams, D. C., & Woodley, S. K. (2023). Effects of exogenous elevation of corticosterone on immunity and the skin microbiome of eastern newts (*Notophthalmus viridescens*). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1882), 20220120. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0120>
173. Peterson, J. D., Steffen, J. E., Reinert, L. K., Cobine, P. A., Appel, A., Rollins-Smith, L., & Mendonça, M. T. (2013). Host Stress Response Is Important for the Pathogenesis of the Deadly Amphibian Disease, Chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *PLoS ONE*, 8(4), e62146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062146>
174. Piovia-Scott, J., Rejmanek, D., Woodhams, D. C., Worth, S. J., Kenny, H., McKenzie, V., Lawler, S. P., & Foley, J. E. (2017). Greater Species Richness of

Bacterial Skin Symbionts Better Suppresses the Amphibian Fungal Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis*. *Microbial Ecology*, 74(1), 217-226. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0916-4>

175. Plassais, J., Gbikpi-Benissan, G., Figarol, M., Scheperjans, F., Gorochov, G., Derkinderen, P., & Cervino, A. C. L. (2021). Gut microbiome alpha-diversity is not a marker of Parkinson's disease and multiple sclerosis. *Brain Communications*, 3(2), fcab113. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab113>
176. Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., & Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(2), 123-132. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>
177. Rádis-Baptista, G. (2021). Cell-Penetrating Peptides Derived from Animal Venoms and Toxins. *Toxins*, 13(2), 147. <https://doi.org/10.3390/toxins13020147>
178. Raghavendra, K., Sharma, P., & Dash, A. P. (2008). Biological control of mosquito populations through frogs: Opportunities & constrains. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(1), 22-25.
179. Ramsey, J. P., Reinert, L. K., Harper, L. K., Woodhams, D. C., & Rollins-Smith, L. A. (2010). Immune Defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Fungus Linked to Global Amphibian Declines, in the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*, 78(9), 3981-3992. <https://doi.org/10.1128/IAI.00402-10>
180. Rebollar, E. A., Bridges, T., Hughey, M. C., Medina, D., Belden, L. K., & Harris, R. N. (2019). Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. *The ISME Journal*, 13(7), 1763-1775. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0388-x>
181. Ribas, L., Li, M.-S., Doddington, B. J., Robert, J., Seidel, J. A., Kroll, J. S., Zimmerman, L. B., Grassly, N. C., Garner, T. W. J., & Fisher, M. C. (2009). Expression Profiling the Temperature-Dependent Amphibian Response to Infection

by *Batrachochytrium dendrobatidis*. PLoS ONE, 4(12), e8408.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008408>

182. Ribas, M. P., Cabezón, O., Velarde, R., Estruch, J., Serrano, E., Bosch, J., Thumsová, B., & Martínez-Silvestre, A. (2022). Coinfection of Chytrid Fungi in Urodeles during an Outbreak of Chytridiomycosis in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 58(3). <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00170>
183. Ringø, E. (2024). Carnobacteria in fish. *Aquaculture and Fisheries*, 9(2), 193-205. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.10.006>
184. Riquelme, E., Zhang, Y., Zhang, L., Montiel, M., Zoltan, M., Dong, W., Quesada, P., Sahin, I., Chandra, V., San Lucas, A., Scheet, P., Xu, H., Hanash, S. M., Feng, L., Burks, J. K., Do, K.-A., Peterson, C. B., Nejman, D., Tzeng, C.-W. D., ... McAllister, F. (2019). Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell*, 178(4), 795-806.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.008>
185. Roberts, A. A., Berger, L., Robertson, S. G., Webb, R. J., Kosch, T. A., McFadden, M., Skerratt, L. F., Glass, B. D., Motti, C. A., & Brannelly, L. A. (2019). The efficacy and pharmacokinetics of terbinafine against the frog-killing fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Medical Mycology*, 57(2), 204-214. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy010>
186. Rodriguez, K. M., & Voyles, J. (2020). The amphibian complement system and chytridiomycosis. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(10), 706-719. <https://doi.org/10.1002/jez.2419>
187. Rollins-Smith, L. A. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*, 166, 221-230.
188. Rollins-Smith, L. A. (2009). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(8), 1593-1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>

189. Rollins-Smith, L. A. (2020). Global Amphibian Declines, Disease, and the Ongoing Battle between *Batrachochytrium* Fungi and the Immune System. *Herpetologica*, 76(2), 178. <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.178>
190. Rollins-Smith, L. A., & Le Sage, E. H. (2021). *Batrachochytrium* fungi: Stealth invaders in amphibian skin. *Current Opinion in Microbiology*, 61, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.04.002>
191. Röttjers, L., & Faust, K. (2018). From hairballs to hypotheses—biological insights from microbial networks. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 761-780. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy030>
192. Ruan, D., Young, A., & Montana, G. (2015). Differential analysis of biological networks. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0735-5>
193. Ruengsomwong, S., La-ongkham, O., Jiang, J., Wannissorn, B., Nakayama, J., & Nitisinprasert, S. (2016). Microbial Community of Healthy Thai Vegetarians and Non-Vegetarians, Their Core Gut Microbiota, and Pathogen Risk. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1723-1735. <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03057>
194. Ruiz, V. L., & Robert, J. (2023). The amphibian immune system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1882), 20220123. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0123>
195. Salazar, J., González, J., Riofrío, R., Siavichay, F., Carrera, M., Mogrovejo, A., Barrera-Galicia, G., & Valdez-Tenezaca, A. (2025). MALDI-TOF Mass Spectrometry Characterization of Culturable Microbiota Associated with the Skin of Amphibians from the Southern Andes Mountains of Ecuador. *Microbial Ecology*, 88(1), 47. <https://doi.org/10.1007/s00248-025-02555-8>
196. Salvatore, M. M., Maione, A., La Pietra, A., Carraturo, F., Staropoli, A., Vinale, F., Andolfi, A., Salvatore, F., Guida, M., & Galdiero, E. (2022). A model for microbial interactions and metabolomic alterations in *Candida glabrata*-

- Staphylococcus epidermidis dual-species biofilms. *PloS One*, 17(12), e0279069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279069>
197. Sanchez, E., Bletz, M. C., Duntsch, L., Bhujy, S., Geffers, R., Jarek, M., Dohrmann, A. B., Tebbe, C. C., Steinfartz, S., & Vences, M. (2017). Cutaneous Bacterial Communities of a Poisonous Salamander: A Perspective from Life Stages, Body Parts and Environmental Conditions. *Microbial Ecology*, 73(2), 455-465. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0863-0>
198. Sánchez-Morgado, J. M., Gallagher, A., & Johnson, L. K. (2009). *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Laboratory Animals*, 43(3), 300-303. <https://doi.org/10.1258/la.2008.008035>
199. Santus, W., Devlin, J. R., & Behnsen, J. (2021). Crossing Kingdoms: How the Mycobiota and Fungal-Bacterial Interactions Impact Host Health and Disease. *Infection and Immunity*, 89(4), e00648-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00648-20>
200. Scharschmidt, T. C., & Segre, J. A. (2025). Skin microbiome and dermatologic disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 135(3), e184315. <https://doi.org/10.1172/JCI184315>
201. Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De La Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
202. Schilliger, L., Paillusseau, C., François, C., & Bonwitt, J. (2023). Major Emerging Fungal Diseases of Reptiles and Amphibians. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(3), 429. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030429>
203. Sette, C. M., Vredenburg, V. T., & Zink, A. G. (2020). Differences in Fungal Disease Dynamics in Co-occurring Terrestrial and Aquatic Amphibians. *EcoHealth*, 17(3), 302-314. <https://doi.org/10.1007/s10393-020-01501-z>

204. Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 66(4), 236-248. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>
205. Sherid, M., Samo, S., Sulaiman, S., Husein, H., Sifuentes, H., & Sridhar, S. (2016). Liver abscess and bacteremia caused by lactobacillus: ¿Role of probiotics? Case report and review of the literature. *BMC Gastroenterology*, 16(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0552-y>
206. Shin, C. M., Kim, N., Kim, Y. S., Nam, R. H., Park, J. H., Lee, D. H., Seok, Y.-J., Kim, Y.-R., Kim, J.-H., Kim, J. M., Kim, J. S., & Jung, H. C. (2016). Impact of Long-Term Proton Pump Inhibitor Therapy on Gut Microbiota in F344 Rats: Pilot Study. *Gut and Liver*, 10(6), 896-901. <https://doi.org/10.5009/gnl15529>
207. Silva, O. N., Torres, M. D. T., Cao, J., Alves, E. S. F., Rodrigues, L. V., Resende, J. M., Lião, L. M., Porto, W. F., Fensterseifer, I. C. M., Lu, T. K., Franco, O. L., & De La Fuente-Nunez, C. (2020). Repurposing a peptide toxin from wasp venom into antiinfectives with dual antimicrobial and immunomodulatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(43), 26936-26945. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012379117>
208. Sinha, S., Lin, G., & Ferenczi, K. (2021). The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clinics in Dermatology*, 39(5), 829-839. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.08.021>
209. Spotila, J. R. (1972). Role of Temperature and Water in the Ecology of Lungless Salamanders. *Ecological Monographs*, 42(1), 95-125. <https://doi.org/10.2307/1942232>
210. Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B. R., Rouffaer, L. O., Van Praet, S., Schaub, M., Canessa, S., Laudelout, A., Kinet, T., Adriaensen, C., Haesebrouck, F., Bert, W., Bossuyt, F., & Martel, A. (2017). Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature*, 544(7650), 353-356. <https://doi.org/10.1038/nature22059>
211. Steigerwald, E., Chen, J., Oshiro, J., Vredenburg, V. T., Catenazzi, A., & Koo, M. S. (2024). Microreserves are an important tool for amphibian conservation. *Communications Biology*, 7(1), 1177. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06510-0>

212. Stevens, E. J., Bates, K. A., & King, K. C. (2021). Host microbiota can facilitate pathogen infection. *PLOS Pathogens*, *17*(5), e1009514. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009514>
213. Stevens, E. J., Li, J. D., Hector, T. E., Drew, G. C., Hoang, K., Greenrod, S. T. E., Paterson, S., & King, K. C. (2025). Within-host competition causes pathogen molecular evolution and perpetual microbiota dysbiosis. *The ISME Journal*, *19*(1), wraf071. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wraf071>
214. Sun, D., Herath, J., Zhou, S., Ellepola, G., & Meegaskumbura, M. (2023). Associations of *Batrachochytrium dendrobatidis* with skin bacteria and fungi on Asian amphibian hosts. *ISME Communications*, *3*(1), 123. <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00332-7>
215. Sze, M. A., & Schloss, P. D. (2016). Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *mBio*, *7*(4), e01018-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01018-16>
216. Takahashi, H., Asakura, M., Ide, T., & Hayakawa, T. (2024). Mutational analysis of the transmembrane α 4-helix of *Bacillus thuringiensis* mosquito-larvicidal Cry4Aa toxin. *Current Microbiology*, *81*(3), 80. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03602-8>
217. Tewari, N., & Dey, P. (2024). Navigating commensal dysbiosis: Gastrointestinal host-pathogen interplay orchestrating opportunistic infections. *Microbiological Research*, *286*, 127832. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127832>
218. Thekkiniath, J. C., Zabet-Moghaddam, M., San Francisco, S. K., & San Francisco, M. J. (2013). A novel subtilisin-like serine protease of *Batrachochytrium dendrobatidis* is induced by thyroid hormone and degrades antimicrobial peptides. *Fungal Biology*, *117*(6), 451-461. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.05.002>
219. Thekkiniath, J., Zabet-Moghaddam, M., Kottapalli, K. R., Pasham, M. R., San Francisco, S., & San Francisco, M. (2015). Quantitative Proteomics of an Amphibian Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, following Exposure to Thyroid

Hormone. *PLOS ONE*, 10(6), e0123637.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123637>

220. Thumsová, B., Alarcos, G., Ayres, C., Rosa, G. M., & Bosch, J. (2024). Relationship between two pathogens in an amphibian community that experienced mass mortalities. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 38(3), e14196. <https://doi.org/10.1111/cobi.14196>
221. Tijare, P., Mehta, N. K., & Raghava, G. P. S. (2025). *Benchmarking of Quantum SVM and Classical ML Algorithms for Prediction of Therapeutic Proteins*. <https://doi.org/10.1101/2025.04.30.651419>
222. Ting, N. L.-N., Lau, H. C.-H., & Yu, J. (2022). Cancer pharmacomicrobiomics: Targeting microbiota to optimise cancer therapy outcomes. *Gut*, 71(7), 1412-1425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326264>
223. Tomic-Canic, M., Burgess, J. L., O'Neill, K. E., Strbo, N., & Pastar, I. (2020). Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(S1), 36-43. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w>
224. Tornabene, B. J., Hossack, B. R., Crespi, E. J., & Breuner, C. W. (2021). Evaluating corticosterone as a biomarker for amphibians exposed to increased salinity and ambient corticosterone. *Conservation Physiology*, 9(1), coab049. <https://doi.org/10.1093/conphys/coab049>
225. Torres-Carrillo, N., Martínez-López, E., Torres-Carrillo, N. M., López-Quintero, A., Moreno-Ortiz, J. M., González-Mercado, A., & Gutiérrez-Hurtado, I. A. (2023). Pharmacomicrobiomics and Drug–Infection Interactions: The Impact of Commensal, Symbiotic and Pathogenic Microorganisms on a Host Response to Drug Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 17100. <https://doi.org/10.3390/ijms242317100>
226. Towe, A. E., Gray, M. J., Carter, E. D., Wilber, M. Q., Ossiboff, R. J., Ash, K., Bohanon, M., Bajo, B. A., & Miller, D. L. (2021). *Batrachochytrium salamandrivorans* can Devour more than Salamanders. *Journal of Wildlife Diseases*, 57(4). <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00214>

227. Tyler, M. J., Shearman, D. J., Franco, R., O'Brien, P., Seamark, R. F., & Kelly, R. (1983). Inhibition of gastric acid secretion in the gastric brooding frog, *Rheobatrachus silus*. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4597), 609-610. <https://doi.org/10.1126/science.6573024>
228. Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, Md. K. H., Gajdacs, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, Md. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750-1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
229. Vaelli, P. M., Theis, K. R., Williams, J. E., O'Connell, L. A., Foster, J. A., & Eisthen, H. L. (2020). The skin microbiome facilitates adaptive tetrodotoxin production in poisonous newts. *eLife*, 9, e53898. <https://doi.org/10.7554/eLife.53898>
230. Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research*, 46(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0266-0>
231. Vanhoefer, U., Harstrick, A., Achterath, W., Cao, S., Seeber, S., & Rustum, Y. M. (2001). Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: Clinical overview. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(5), 1501-1518. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.5.1501>
232. Varga, J. F. A., Bui-Marinos, M. P., & Katzenback, B. A. (2019). Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in Immunology*, 9, 3128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>
233. Vazquez, V., Rothermel, B., & Pessier, A. (2009). Experimental infection of North American plethodontid salamanders with the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84, 1-7. <https://doi.org/10.3354/dao02026>
234. Venesky, M. D., & Laskey, C. A. (2022). Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis* reduces salamander capacity to mount a cell-mediated immune

- response. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 337(4), 273-281. <https://doi.org/10.1002/jez.2497>
235. Verbrugghe, E., Van Rooij, P., Favoreel, H., Martel, A., & Pasmans, F. (2019). In vitro modeling of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection of the amphibian skin. *PloS One*, 14(11), e0225224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225224>
236. Voyles, J., Johnson, L. R., Rohr, J., Kelly, R., Barron, C., Miller, D., Minster, J., & Rosenblum, E. B. (2017). Diversity in growth patterns among strains of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* across extended thermal optima. *Oecologia*, 184(2), 363-373. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3866-8>
237. Walke, J. B., Becker, M. H., Loftus, S. C., House, L. L., Cormier, G., Jensen, R. V., & Belden, L. K. (2014). Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME Journal*, 8(11), 2207-2217. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.77>
238. Wan, B., Chen, G., Poon, E. S. K., Fung, H. S., Lau, A., & Sin, S. Y. W. (2024). Environmental factors and host sex influence the skin microbiota structure of Hong Kong newt (*Paramesotriton hongkongensis*) in a coldspot of chytridiomycosis in subtropical East Asia. *Integrative Zoology*. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12855>
239. Wan, B., Chen, G., Poon, E. S. K., Fung, H. S., Lau, A., & Sin, S. Y. W. (2025). Environmental factors and host sex influence the skin microbiota structure of Hong Kong newt (*Paramesotriton hongkongensis*) in a coldspot of chytridiomycosis in subtropical East Asia. *Integrative Zoology*, 20(2), 236-255. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12855>
240. Weersma, R. K., Zhernakova, A., & Fu, J. (2020). Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut*, 69(8), 1510-1519. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320204>
241. Wei, D., Cheng, Y., Liao, W., Yu, Q., Shi, J., Xia, X., Chen, M., Han, S., & Li, P. (2023). Composition and function of the skin microbiota were altered of red

- leg syndrome in cultured bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Aquaculture Reports*, 29, 101487. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101487>
242. Wei, M., Flowers, L., Knight, S. A. B., Zheng, Q., Murga-Garrido, S., Uberoi, A., Pan, J. T.-C., Walsh, J., Schroeder, E., Chu, E. W., Campbell, A., Shin, D., Bradley, C. W., Duran-Struuck, R., & Grice, E. A. (2023). Harnessing diversity and antagonism within the pig skin microbiota to identify novel mediators of colonization resistance to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 8(4), e00177-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00177-23>
243. Will, I., Stevens, E. J., Belcher, T., & King, K. C. (2025). ‘Re-Wilding’ an Animal Model With Microbiota Shifts Immunity and Stress Gene Expression During Infection. *Molecular Ecology*, 34(1), e17586. <https://doi.org/10.1111/mec.17586>
244. Wilson, M. B., Held, B. W., Freiborg, A. H., Blanchette, R. A., & Salomon, C. E. (2017). Resource capture and competitive ability of non-pathogenic *Pseudogymnoascus spp.* And *P. destructans*, the cause of white-nose syndrome in bats. *PloS One*, 12(6), e0178968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178968>
245. Woodhams, D. C., Alford, R. A., Antwis, R. E., Archer, H., Becker, M. H., Belden, L. K., Bell, S. C., Bletz, M., Daskin, J. H., Davis, L. R., Flechas, S. V., Lauer, A., Gonzalez, A., Harris, R. N., Holden, W. M., Hughey, M. C., Ibáñez, R., Knight, R., Kueneman, J., ... McKenzie, V. (2015). Antifungal isolates database of amphibian skin-associated bacteria and function against emerging fungal pathogens: *Ecological Archives* E096-059. *Ecology*, 96(2), 595-595. <https://doi.org/10.1890/14-1837.1>
246. Woodhams, D. C., LaBumbard, B. C., Barnhart, K. L., Becker, M. H., Bletz, M. C., Escobar, L. A., Flechas, S. V., Forman, M. E., Iannetta, A. A., Joyce, M. D., Rabemananjara, F., Gratwicke, B., Vences, M., & Minbiole, K. P. C. (2018). Prodigiosin, Violacein, and Volatile Organic Compounds Produced by Widespread Cutaneous Bacteria of Amphibians Can Inhibit Two *Batrachochytrium* Fungal Pathogens. *Microbial Ecology*, 75(4), 1049-1062. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1095-7>

247. Woodhams, D. C., Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., Lam, B. A., Harris, R. N., Briggs, C. J., Vredenburg, V. T., Patel, B. T., Caprioli, R. M., Chaurand, P., Hunziker, P., & Bigler, L. (2020). Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria. *Microbial Ecology*, *79*(1), 192-202. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01385-9>
248. Wu, G., Xu, T., Zhao, N., Lam, Y. Y., Ding, X., Wei, D., Fan, J., Shi, Y., Li, X., Li, M., Ji, S., Wang, X., Fu, H., Zhang, F., Shi, Y., Zhang, C., Peng, Y., & Zhao, L. (2024). A core microbiome signature as an indicator of health. *Cell*, *187*(23), 6550-6565.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.019>
249. Wu-Chuang, A., Mateos-Hernandez, L., Abuin-Denis, L., Maitre, A., Avellanet, J., García, A., Fuentes, D., & Cabezas-Cruz, A. (2024). Exploring the impact of breast cancer on colonization resistance of mouse microbiota using network node manipulation. *Heliyon*, *10*(10), e30914. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30914>
250. Xiang, J., He, T., Wang, P., Xie, M., Xiang, J., & Ni, J. (2018). Opportunistic pathogens are abundant in the gut of cultured giant spiny frog (*Paa spinosa*). *Aquaculture Research*, *49*(5), 2033-2041. <https://doi.org/10.1111/are.13660>
251. Xiao, L., Zhang, F., & Zhao, F. (2022). Large-scale microbiome data integration enables robust biomarker identification. *Nature Computational Science*, *2*(5), 307-316. <https://doi.org/10.1038/s43588-022-00247-8>
252. Xie, G. Y., Olson, D. H., & Blaustein, A. R. (2016). Projecting the Global Distribution of the Emerging Amphibian Fungal Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Based on IPCC Climate Futures. *PLOS ONE*, *11*(8), e0160746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160746>
253. Xu, L., Xiang, M., Zhu, W., Zhang, M., Chen, H., Huang, J., Chen, Y., Chang, Q., Jiang, J., & Zhu, L. (2020). The Behavior of Amphibians Shapes Their Symbiotic Microbiomes. *mSystems*, *5*(4), e00626-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00626-20>
254. Yang, J., Pu, J., Lu, S., Bai, X., Wu, Y., Jin, D., Cheng, Y., Zhang, G., Zhu, W., Luo, X., Rosselló-Móra, R., & Xu, J. (2020). Species-Level Analysis of Human

- Gut Microbiota With Metataxonomics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02029>
255. Yang, Y., Qu, L., Mijakovic, I., & Wei, Y. (2022). Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01901-6>
256. Yap, T. A., Koo, M. S., Ambrose, R. F., & Vredenburg, V. T. (2018). Introduced bullfrog facilitates pathogen invasion in the western United States. *PLOS ONE*, 13(4), e0188384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188384>
257. Ye, T., He, S., Li, J., Luo, J., Yang, S., Wang, P., & Li, C. (2024). Metagenomic and transcriptomic analysis revealing the impact of oxytetracycline and ciprofloxacin on gut microbiota and gene expression in the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 271, 106925. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106925>
258. Ye, Z., Fu, L., Li, S., Chen, Z., Ouyang, J., Shang, X., Liu, Y., Gao, L., & Wang, Y. (2024). Synergistic collaboration between AMPs and non-direct antimicrobial cationic peptides. *Nature Communications*, 15(1), 7319. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51730-x>
259. Young, B. C., Wu, C.-H., Gordon, N. C., Cole, K., Price, J. R., Liu, E., Sheppard, A. E., Perera, S., Charlesworth, J., Golubchik, T., Iqbal, Z., Bowden, R., Massey, R. C., Paul, J., Crook, D. W., Peto, T. E., Walker, A. S., Llewelyn, M. J., Wyllie, D. H., & Wilson, D. J. (2017). Severe infections emerge from commensal bacteria by adaptive evolution. *eLife*, 6, e30637. <https://doi.org/10.7554/eLife.30637>
260. Young, S., Berger, L., & Speare, R. (2007). Amphibian chytridiomycosis: Strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook*, 41(1), 85-95. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00010.x>
261. Zhai, R., Zhao, C., Chang, L., Liu, J., Zhao, T., Jiang, J., & Zhu, W. (2025). The gut-liver axis plays a limited role in mediating the liver's heat susceptibility of Chinese giant salamander. *BMC Genomics*, 26(1), 475. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11644-4>

262. Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., Mao, Y., Zhang, X., Pang, X., Wei, C., Zhao, G., Chen, Y., & Zhao, L. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal*, 4(2), 232-241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>
263. Zhang, H., Ma, H., Deng, J., Zhao, H., Fang, C., Zhang, J., Wang, Q., Zhang, H., Jiang, W., & Kong, F. (2024). Seasonality influences skin bacterial community structure and anti-Bd function in two anuran species. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1463563. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1463563>
264. Zhu, W., Zhao, C., Feng, J., Chang, J., Zhu, W., Chang, L., Liu, J., Xie, F., Li, C., Jiang, J., & Zhao, T. (2022). Effects of Habitat River Microbiome on the Symbiotic Microbiota and Multi-Organ Gene Expression of Captive-Bred Chinese Giant Salamander. *Frontiers in Microbiology*, 13, 884880. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.884880>
265. Zickenrott, S., Angarica, V. E., Upadhyaya, B. B., & Del Sol, A. (2016). Prediction of disease–gene–drug relationships following a differential network analysis. *Cell Death & Disease*, 7(1).

ANEXOS

Tabla suplementaria 1. Identificación de patógenos oportunistas en la piel de salamandras. En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados obtenidos del programa, la identificación de bacterias patógenas que se llevó a cabo con los archivos FASTQ en crudo para animales de los géneros *Ambystoma*, *Desmognathus*, *Eurycea* y *Notophthalmus*. Podemos ver en la primera columna los nombres de las bacterias, en la siguiente el número de lecturas que coincidían con la secuencia de las bacterias a detectar y el porcentaje de esas mismas lecturas.

Ambystoma altamirani			Desmognathus monticola			Eurycea bislineata			Notophthalmus viridicens		
Species	Match_num	Percentage	Species	Match_num	Percentage	Species	Match_num	Percentage	Species	Match_num	Percentage
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4619	17.371	<i>Vibrio fluvialis</i>	5794	10.544	<i>Vibrio fluvialis</i>	8918	14.316	<i>Vibrio fluvialis</i>	6507	11.374
<i>Edwardsiella tarda</i>	2333	8.774	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	624	1.136	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1477	2.371	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1113	1.946
<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	0.376	<i>Vibrio vulnificus</i>	268	0.488	<i>Neisseria pneumoniae</i>	477	0.766	<i>Neisseria pneumoniae</i>	308	0.538
<i>Acinetobacter baumannii</i>	28	0.105	<i>Neisseria pneumoniae</i>	187	0.34	<i>Vibrio vulnificus</i>	360	0.578	<i>Edwardsiella tarda</i>	279	0.488
<i>Neisseria pneumoniae</i>	28	0.105	<i>Enterobacter cloacae</i>	55	0.1	<i>Edwardsiella tarda</i>	343	0.551	<i>Vibrio vulnificus</i>	212	0.371
<i>Bacillus cereus</i>	22	0.083	<i>Alipia broomeae</i>	52	0.095	<i>Enterobacter cloacae</i>	97	0.156	<i>Enterobacter cloacae</i>	63	0.11
<i>Yersinia pestis</i>	22	0.083	<i>Enterobacter aerogenes</i>	41	0.075	<i>Enterobacter aerogenes</i>	67	0.108	<i>Enterobacter aerogenes</i>	47	0.082
<i>Serratia marcescens</i>	18	0.068	<i>Bacillus anthracis</i>	34	0.062	<i>Enterobacter asburiae</i>	52	0.083	<i>Bacillus anthracis</i>	33	0.058
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	17	0.064	<i>Brucella canis</i>	28	0.051	<i>Enterobacter ludwigii</i>	45	0.072	<i>Enterobacter asburiae</i>	31	0.054
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	13	0.049	<i>Enterobacter kobei</i>	20	0.036	<i>Bacillus anthracis</i>	31	0.05	<i>Enterobacter ludwigii</i>	24	0.042
<i>Aeromonas punctata</i>	13	0.049	<i>Enterobacter ludwigii</i>	20	0.036	<i>Enterococcus faecium</i>	25	0.04	<i>Enterococcus faecalis</i>	21	0.037
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	7	0.026	<i>Enterococcus faecium</i>	19	0.035	<i>Enterococcus faecalis</i>	20	0.032	<i>Enterococcus faecium</i>	18	0.031
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	0.015	<i>Enterobacter asburiae</i>	18	0.033	<i>Aeromonas hydrophila</i>	19	0.03	<i>Aeromonas hydrophila</i>	17	0.03
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	0.015	<i>Citrobacter freundii</i>	17	0.031	<i>Enterobacter hormaechei</i>	19	0.03	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	13	0.023
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	0.011	<i>Edwardsiella tarda</i>	17	0.031	<i>Brucella canis</i>	18	0.029	<i>Enterobacter kobei</i>	13	0.023
<i>Alipia broomeae</i>	3	0.011	<i>Enterobacter Sakazaki</i>	14	0.025	<i>Brucella ovis</i>	18	0.029	<i>Brucella canis</i>	11	0.019
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1	0.004	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	13	0.024	<i>Citrobacter freundii</i>	17	0.027	<i>Citrobacter freundii</i>	10	0.017
<i>Enterobacter mori</i>	1	0.004	<i>Enterobacter hormaechei</i>	11	0.02	<i>Neisseria oxytoca</i>	16	0.026	<i>Enterobacter hormaechei</i>	10	0.017
<i>Alipia massiliensis</i>	1	0.004	<i>Alipia massiliensis</i>	11	0.02	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	15	0.024	<i>Brucella ovis</i>	7	0.012
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0.004	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	10	0.018	<i>Serratia marcescens</i>	15	0.024	<i>Alipia broomeae</i>	7	0.012
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	0.004	<i>Nocardia farcinica</i>	10	0.018	<i>Enterobacter kobei</i>	14	0.022	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	0.01
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.004	<i>Brucella ovis</i>	10	0.018	<i>Alipia broomeae</i>	14	0.022	<i>Yersinia pestis</i>	5	0.009
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	0.004	<i>Aeromonas hydrophila</i>	9	0.016	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	0.019	<i>Serratia marcescens</i>	4	0.007
<i>Alipia birgiae</i>	1	0.004	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	8	0.015	<i>Yersinia pestis</i>	11	0.018	<i>Brucella neotomae</i>	3	0.005
<i>Enterobacter soli</i>	1	0.004	<i>Serratia marcescens</i>	7	0.013	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	6	0.01	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	3	0.005

Nota. Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

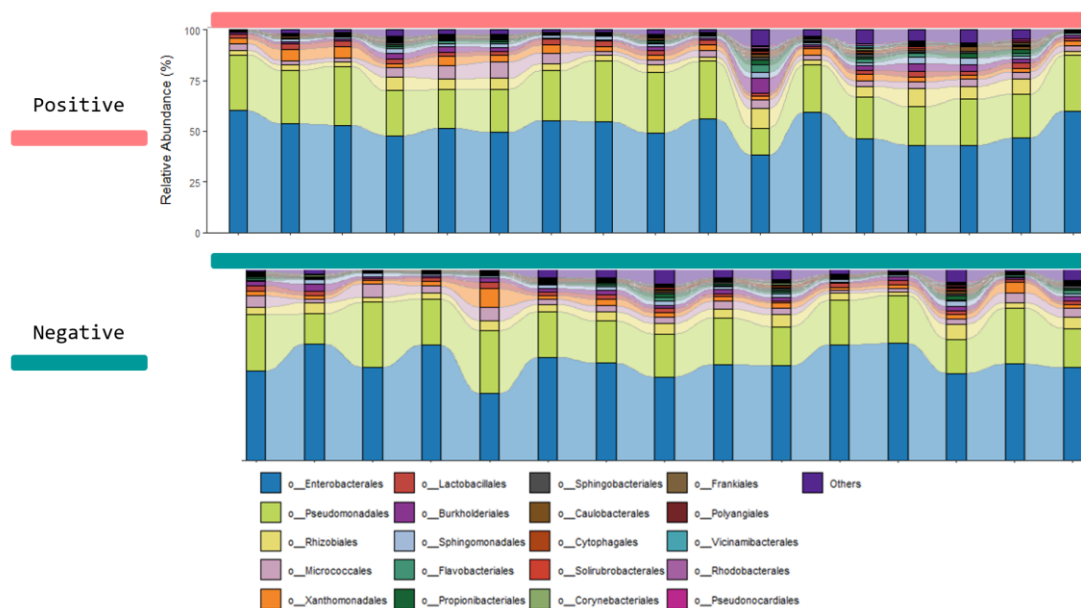


Figura suplementaria 1. Abundancias nivel Orden. Esta figura muestra las diferencias en las abundancias relativas correspondientes a los dos grupos de condiciones positivas para *Bd* (rosa) y negativas para *Bd* (verde). Los demás colores en las barras apiladas representan el nivel de orden de los microorganismos presentes en cada muestra. Dentro de los primeros 7 órdenes representados, se encuentran: Enterobacterales (azul), Pseudomonadales (verde), Rhizobiales (amarillo), Micrococcales (rosa), Xanthomonadales (naranja), Lactobacillales (rojo) y Burkholderiales (púrpura). Las barras intermedias con transparencia representan los cambios en la abundancia relativa entre cada muestra. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

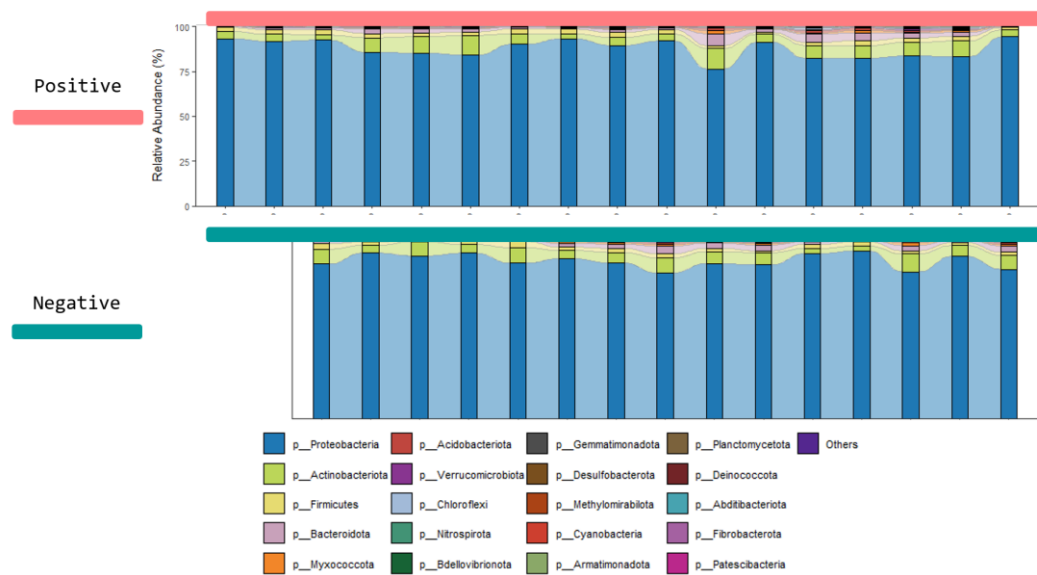


Figura suplementaria 2. Abundancias nivel Phylum. Esta figura muestra las diferencias en las abundancias relativas correspondientes a los dos grupos de condiciones positivas para *Bd* (rosa) y negativas para *Bd* (verde). Los demás colores en las barras apiladas representan a nivel de Phylum los microorganismos presentes en cada muestra. Dentro de los primeros 7 phyla representados, se encuentran: Proteobacteria (azul), Actinobacteriota (verde), Firmicutes (amarillo), Bacteroidota (rosa), Myxococcota (naranja), Acidobacteriota (rojo) y Verrucomicrobiota (púrpura). Las barras intermedias con transparencia representan los cambios en la abundancia relativa entre cada muestra. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

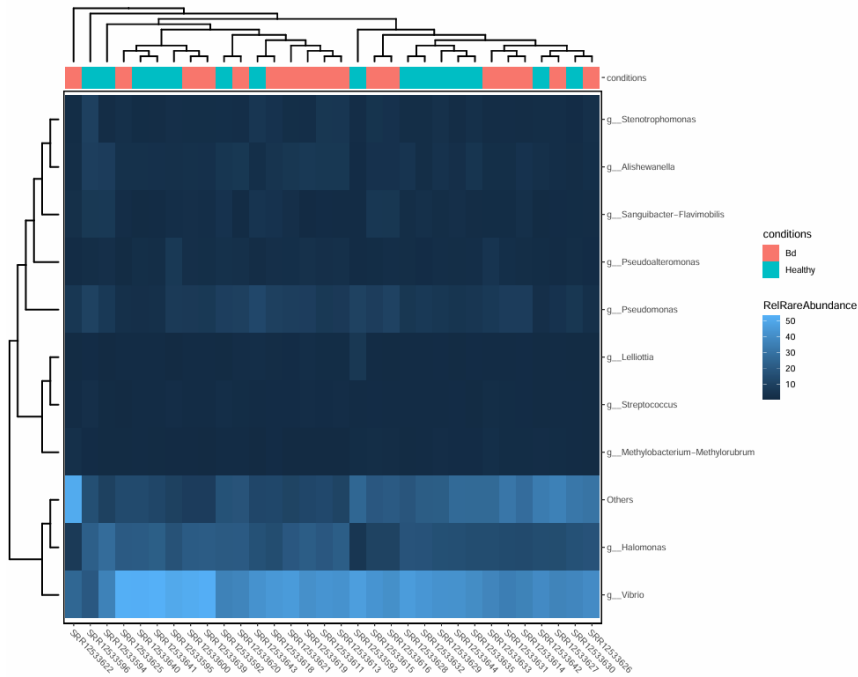


Figura suplementaria 5. Abundancias y distancias por condición. El siguiente heatmap representa las distancias calculadas por el método Bray-Curtis (árboles en los extremos) tanto para cada muestra por condición de detección positiva o negativa a *Bd* como las distancias de los microorganismos encontrados por muestra. El prefijo g__ indica el nombre del microorganismo a nivel de género. La abundancia se calculó como relativa rarificada. La escala de tonos azul representa la proporción de cada género por muestra. Las condiciones de cada grupo de muestra se identifican con los colores rosa para *Bd* y cian para aquellas muestras en las que no se detectó la infección. Cada muestra está etiquetada con un prefijo SRR y un número.

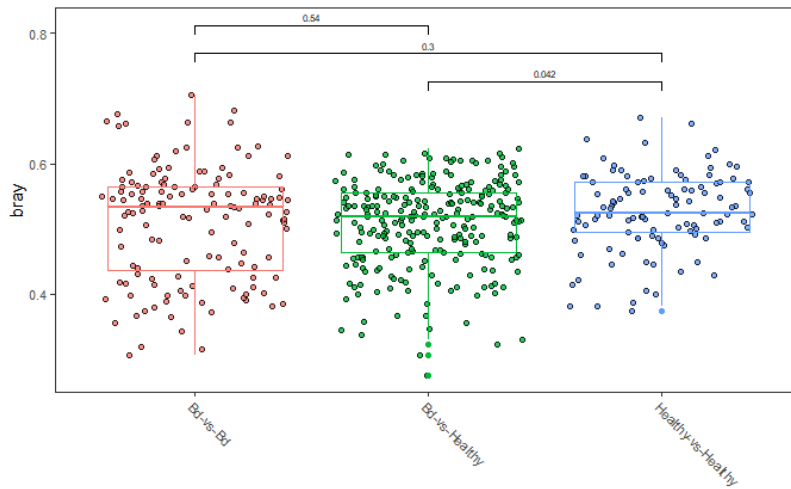


Figura suplementaria 6. Comparación de distancias. El siguiente gráfico representa la comparación de las distancias de Bray-Curtis calculadas dentro de los grupos de animales positivos a la infección (*Bd-vs-Bd*), entre grupos positivos y negativos a la infección por *Bd* (*Bd-vs-Healthy*) y dentro del grupo de animales (negativos) que no tuvieron detección a la infección por *Bd* (*Healthy-vs-Healthy*). No hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos comparados. La prueba de comparación es la predeterminada por el paquete de R utilizado para el análisis MicrobiomeMarker.

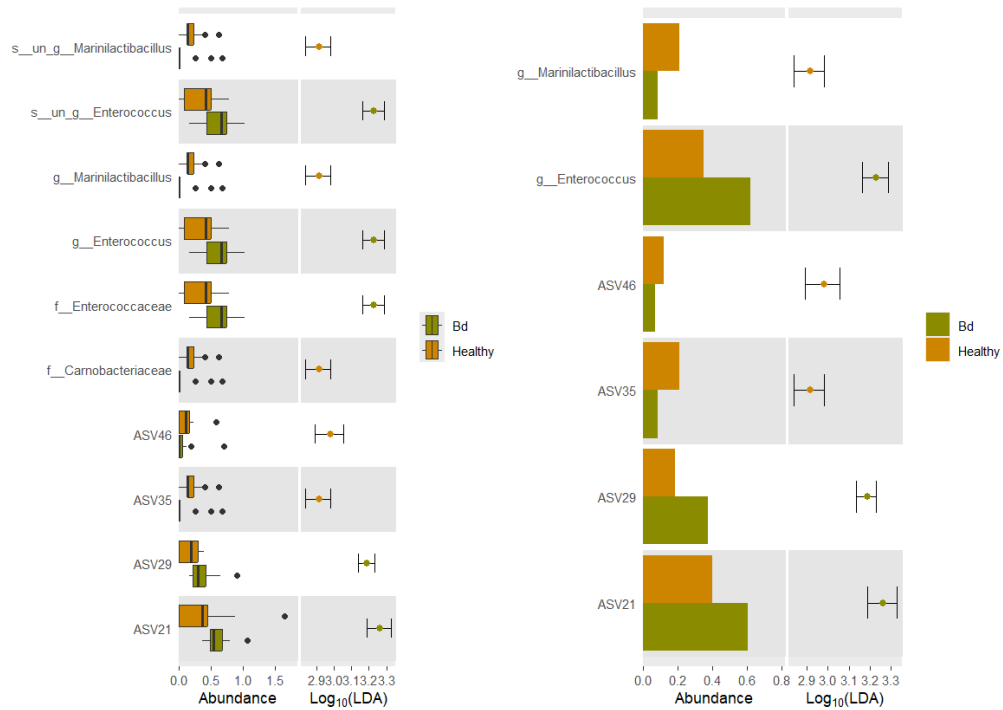


Figura suplementaria 7b. Identificación de biomarcadores. El siguiente gráfico muestra los resultados sobre la identificación de microorganismos diferenciales entre grupos por condición de animales sanos y animales enfermos. La gráfica de barras muestra los resultados del análisis de LDA y el LefSE realizados. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

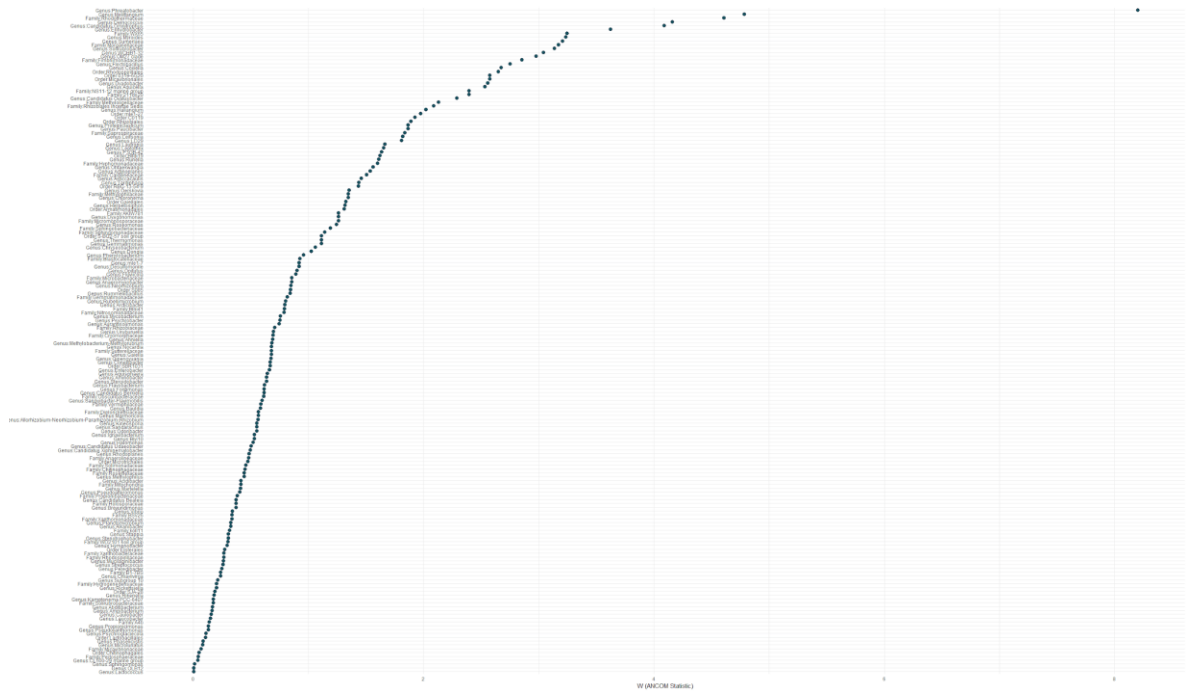


Figura suplementaria 9. Estadístico Wald del método ANCOM-BC nivel género. Se muestra el gráfico correspondiente a los resultados del estadístico Wald de la prueba de ANCOM. En estos se pueden observar los géneros que difieren significativamente entre grupos. Aquellos valores mayores a 0 se toman en cuenta como valores con significancia y los géneros dentro de esos valores son los más significativos y diferenciales. *Nota.* Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

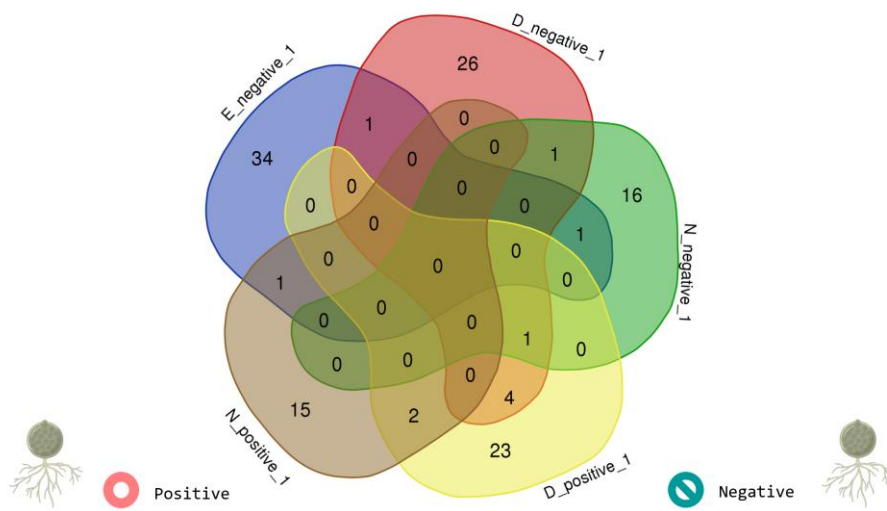


Figura suplementaria 10. Comparación de composición por módulo. Se muestra la comparación de uno de los módulos más importantes mostrados en la figura 25 (rosa). Podemos observar que no hay muchas coincidencias para este módulo. E_negative (*Eurycea* sin infección), D_negative (*Desmognathus* sin infección), N_negative (*Notophthalmus* sin infección). N_positive, D_positive (respectivamente corresponden a *Notophthalmus* y *Desmognathus* positivo a *Bd*). Se omitió *Eurycea* positiva a *Bd*, debido a que no presentó valores de modularidad. **Nota.** Modificado de: Ramírez-Villarreal & Álvarez-Martínez *et al.*, 2025.

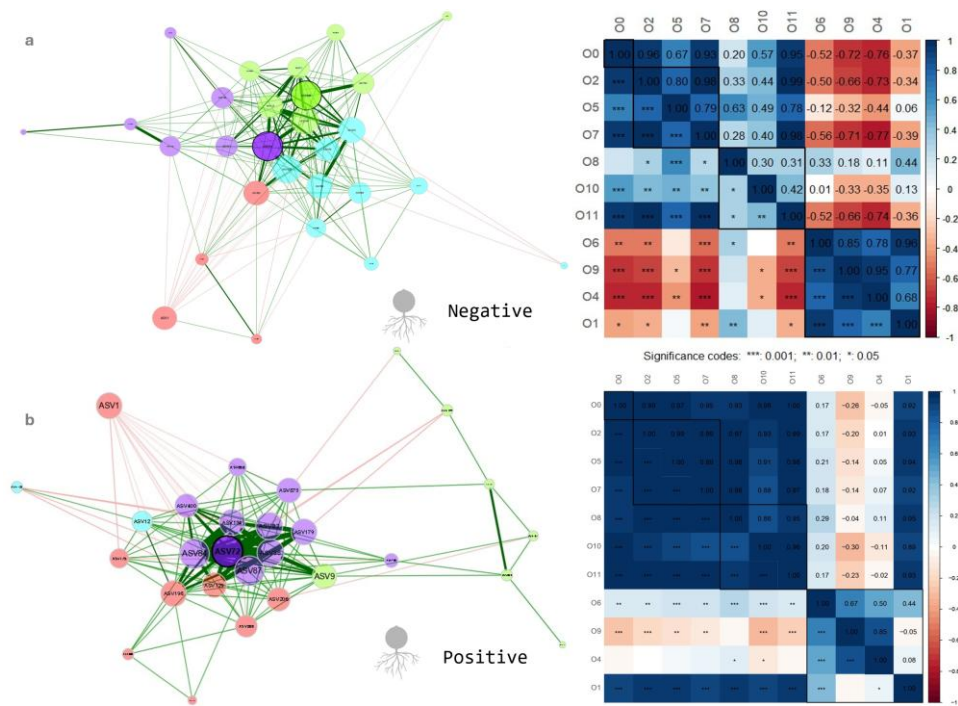


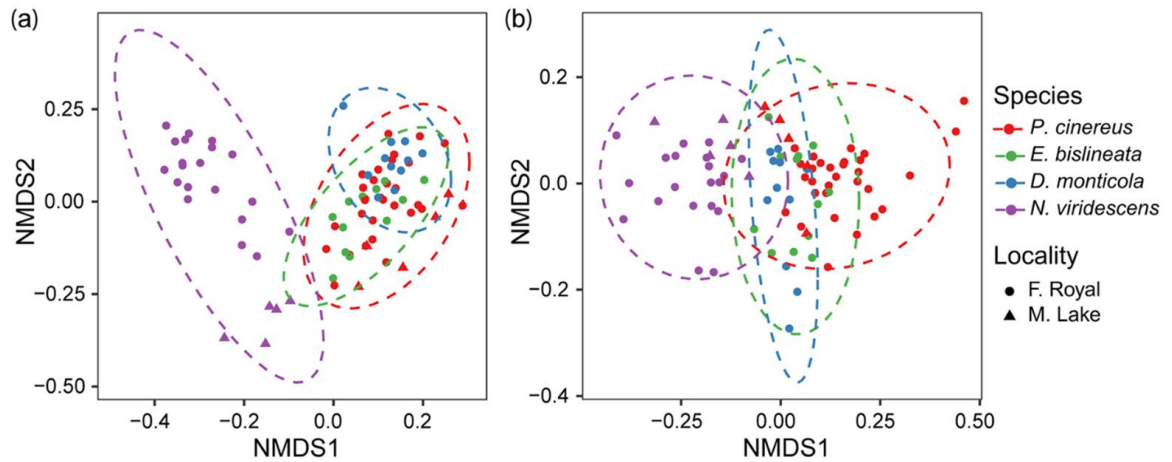
Figura suplementaria 11. Red de correlaciones positivas y negativas. Se muestran las redes de correlaciones positivas inferidas para el caso de todos los animales con detección positiva y detección negativa de la infección.

Nota: Es importante decir, que a pesar de que las especies *Desmognathus* y *Eurycea*, están dentro de una categoría de susceptibilidad idéntica - tolerantes a la infección por *Bd* y *Bsal* (al menos mencionada por el artículo original), las cargas de la infección fueron diferentes para cada especie, lo que nos podría sugerir, que las dos no son tolerantes, al menos una de ellas, podría ser resistente a la infección: *Eurycea*. Es por eso por lo que a continuación se volvieron a analizar por pares de susceptibilidad a las salamandras tomando en cuenta la diferencia de carga en la infección.

Se procedió a anexar los índices de diversidad beta que también fueron calculados por cada categoría de susceptibilidad y los índices beta que la fuente de los datos (Jiménez *et al.*, 2022) obtuvo para su cálculo por sitio de muestreo y por especie de salamandra.

Índices beta: por especie y origen

43



Jiménez *et al.*, 2022

Figura 16. Índices beta (lugar y especie). Esta figura presenta el análisis de diversidad beta calculado por el artículo original en donde toman en cuenta cada una de las especies estudiadas (en este caso estudian además de nuestros modelos de estudio a *Plethodon cinereus*; y toman en cuenta el sitio de muestreo de cada especie de salamandra. Como se puede observar en la figura tomada del artículo de Jiménez *et al.*, 2022, no hay diferencias significativas entre los grupos estudiados ni por especie de salamandra ni por localidad en donde fue adquirida la muestra. Aquí no toman en cuenta el estado de salud del animal.

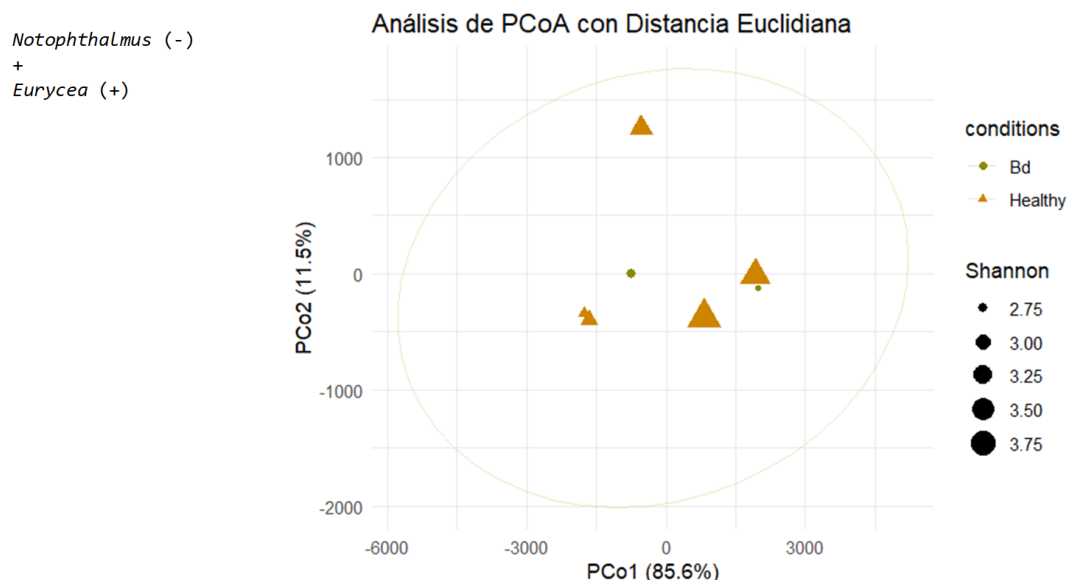


Figura 17. Índices beta (por condición). Esta figura presenta el análisis de diversidad beta calculado en este proyecto para determinar diferencias entre las salamandras por grupo de susceptibilidad. Aquí se presenta en PCoA realizado para *Notophthalmus* negativo, versus *Eurycea* positivo; recordando que tienen diferente susceptibilidad a las infecciones por Bd y Bsal. No se encontraron diferencias entre estas dos especies de salamandras, esto podría deberse a que el tamaño de la muestra disminuyó considerablemente para poder tomar en cuenta la característica de susceptibilidad.

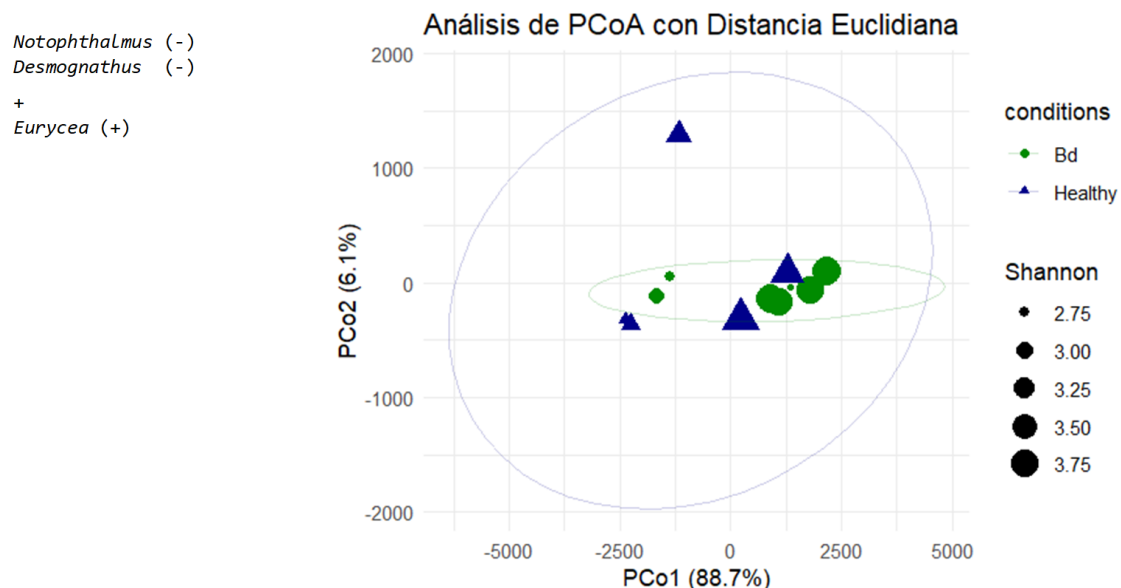


Figura 18. Índices beta (por condición). Esta figura presenta el análisis de diversidad beta calculado en este proyecto para determinar diferencias entre las salamandras por grupo de susceptibilidad. Aquí se presenta en PCoA realizado con *Desmognathus* y *Notophthalmus* (muestras detectadas como negativas) tomados en cuenta como animales susceptibles a la infección y las muestras de *Eurycea* (muestras detectadas como positivas a *Bd*), tomada en cuenta para el análisis como tolerante a la infección por el hongo. Tampoco se puede ver una diferencia clara entre los grupos analizados. Por lo que se sugiere que ambos grupos sin importar su categoría de susceptibilidad, al menos para el nivel general de diversidad alfa y beta, son grupos que tienen un comportamiento similar y las diferencias al menos no se pueden observar en este nivel, aunque sí se observaron en otros niveles de análisis.

Notophthalmus (-)
Desmognathus (-)
 +
Eurycea (+)
Desmognathus (+)

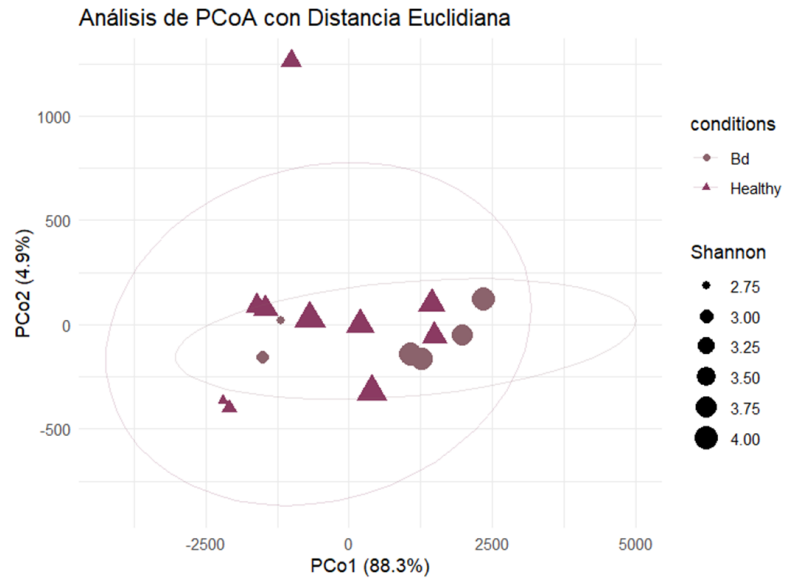
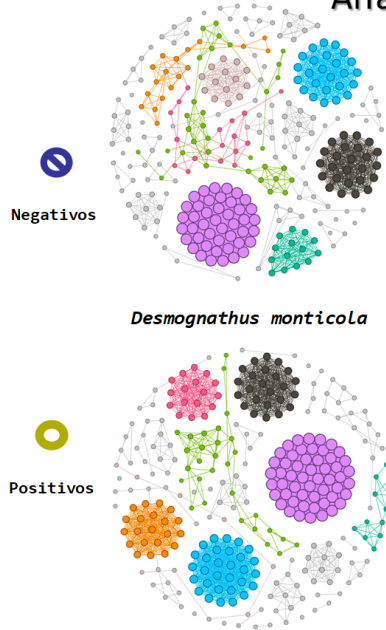


Figura 19. Índices beta (por condición). Esta figura presenta el análisis de diversidad beta calculado en este proyecto para determinar diferencias entre las salamandras por grupo de susceptibilidad. Aquí se presenta en PCoA realizado con *Desmognathus* y *Notophthalmus* (muestras detectadas como negativas) tomados en cuenta como animales susceptibles a la infección y, además, para el caso de animales tolerantes a la infección no solamente se tomaron en cuenta las muestras positivas de la salamandra *Eurycea*, sino también las de *Desmognathus*, que también se encuentra dentro de una categoría de “tolerancia” a la infección. De esta manera se quería igualar el número de muestras para cada grupo de susceptibilidad. De la misma manera que en otros gráficos, no se pudo observar una diferencia clara entre los grupos.

Nota: Es importante decir, que a pesar de que las especies *Desmognathus* y *Eurycea*, están dentro de una categoría de susceptibilidad idéntica - tolerantes a la infección por Bd y Bsal- (al menos mencionada por al artículo original), las cargas de la infección fueron diferentes para cada especie, lo que nos podría sugerir, que las dos no son tolerantes, al menos una de ellas, podría ser resistente a la infección: *Eurycea*.



D(-): *Pseudoxanthomonas*, ***Neisseria***, *Luteitalea*, *Luteibacter*, *Catenuloplanes*, *Methylopila*, *Leifsonia*, *Nannocystis*, *Rhizorhapis*, *Larkinella*, *Oligoflexus*, ***Candidatus chloroploca***, *Niastella*, *Luteimonas*, *Bauldia*, *Pleomorphomonas*, *Terrabacter*, *Hydrocarboniphaga*, *Coxiella*, *Conyzicola*, *Rubrivirga*, *Ahniella*, *Chondromyces*, *Afipia*, *Kocuria*, ***Candidatus endoecteinascidia***, *Bacteriovorax*, *Sumerlaea*, *Skermanella*, *Syntrophobacter*, *Bryocella*, ***Candidatus paracaedibacter***, *Roseiflexus*, *Prevotella_7*, ***Candidatus symbiothrix***, *Verrucomicrobium*, ***Candidatus rhabdochlamydia***, *Cardiobacterium*. **D(+):** *Anaerosinus*, *Paludicola*, *Ruminococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Anaerospobacter*, ***Intestinimonas***, *Agrococcus*, *Lachnoclostridium*, *Buttiauxella*, *Harryflintia*, ***Robinsoniella***, *Gordonibacter*, *Methylocystis*, ***Clostridium sensu stricto 5***, *Mucinivorans*, *Galbitalea*, *Micromonospora*, *Variibacter*, *Paucibacter*, *Akkermansia*, *Romboutsia*, *Alistipes*, *Blastocatella*, *Chitinivorax*, ***Clostridium sensu stricto 13***, *Actinospica*, *Arenimonas*, *Kineococcus*, *Anaerovorax*, *Fronidhabitans*, *Macellibacteroides*, *Porphyromonas*, *Blastococcus*, [*Eubacterium*] *fissicatena* group, *Bosea*, *Azorhizobium*, *Peptococcus*, *Glutamicibacter*, *Dysgonomonas*, ***Candidatus amphibichlamydia***, *Ignavibacterium*, *Deefgea*, ***Candidatus armantifilum***, *Gemmata*, ***Vampirovibrio***, *Parviterribacter*, *Pseudorhodobacter*, ***Candidatus lumbricincola***, *Nevskia*, ***Candidatus paracaedibacter***

Figura 20. Comparación por módulos I. Esta figura presenta una de las comparaciones realizadas a los módulos identificados por el algoritmo de Louvain en las redes que fueron inferidas a nivel de especie. Aquí se Compara el módulo de color rosa/fucsia, para el caso de la salamandra *Desmognathus* (D (+): detección positiva, D (-): detección negativa de *Bd*). Se encontraron algunas coincidencias entre ambos módulos (negritas), sin embargo, en su mayoría son diferentes. Algunos de los géneros tienen potencial patógeno.

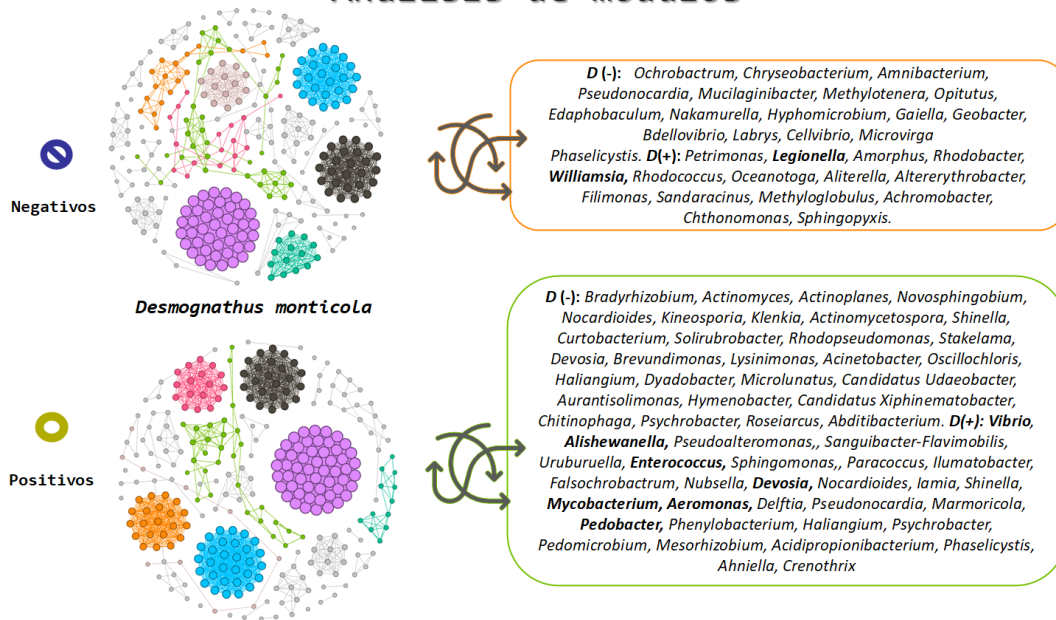


Figura 21. Comparación por módulos II. Esta figura presenta una de las comparaciones realizadas a los módulos identificados por el algoritmo de Louvain en las redes que fueron inferidas a nivel de especie. Aquí se comparó el módulo de color rosa/fucsia, para el caso de la salamandra *Desmognathus* (D (+): detección positiva, D (-): detección negativa de Bd). No se encontraron coincidencias entre los nombres de géneros de bacterias, lo que sí se observó para ambos casos son bacterias de géneros con potencial patógeno. Se puede observar la comparación del módulo naranja en el recuadro naranja y del módulo verde en el recuadro verde, respectivamente.

Nota: Cuando se compara cada módulo por separado, se puede observar que no son similares, aunque por los colores, deberían, por ser la misma especie de salamandra analizada, solo que cambia la categoría de salud. Porque cuando se realiza un análisis en general, sin importar la modularidad, si hay coincidencias entre las listas generales. Esto quiere decir que la red se reorganiza, aunque algunos de los componentes bacterianos son similares, la estructura no.

Bacterias compartidas entre las condiciones

50

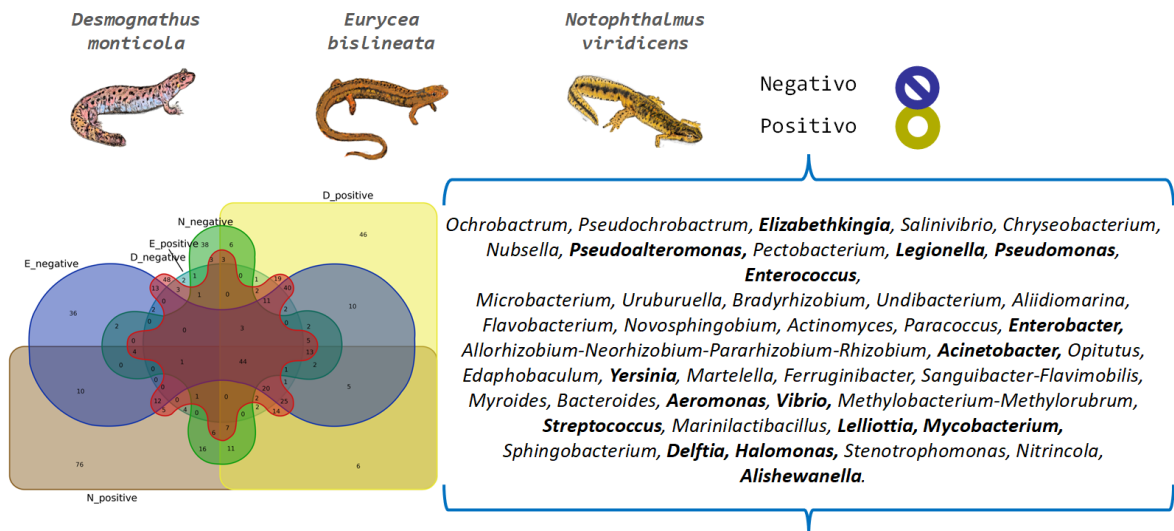


Figura 22. Comparación por módulos III. Esta figura presenta una de las comparaciones generales realizadas en donde hay coincidencias sin importar el estado de detección de Bd. Se muestra aquí un listado de las bacterias que fueron similares entre todas las salamandras en todas las condiciones (positivo/negativo). En negritas se observan aquellos géneros que tienen potencial patógeno.

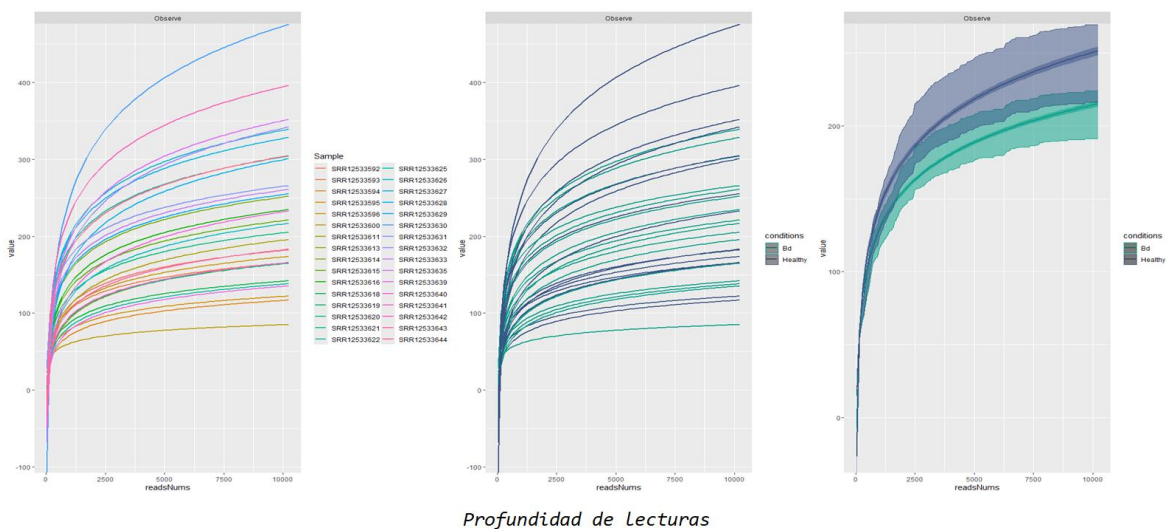


Figura 23. Curvas de rarefacción. Esta figura presenta las curvas de rarefacción obtenidas de cada una de las muestras que se ocuparon en el estudio. Además, en azul y verde (los gráficos II y III, muestran las curvas de rarefacción divididas por condición de salud (sano/enfermo) o (positivo a *Bd* y negativo a *Bd*).