



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en
el péptido Cruzioseptina-1

Sebastián Armando Bermúdez Puga
17 de noviembre del 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador.

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 17 de noviembre de 2021

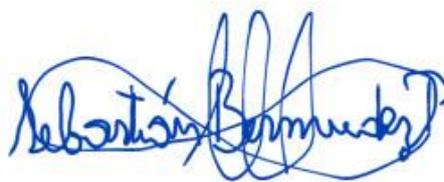
Yo, Sebastián Armando Bermúdez Puga con documento de identidad N° 1207234673, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

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

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Sebastián Armando Bermúdez Puga
1207234673

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Cruzioseptina-1” en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Sebastián Armando Bermúdez Puga, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 17 de noviembre de 2021

Firma:

.....

Carolina Del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 1714818760

Agradecimientos

Agradezco al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam por permitirme realizar mi proyecto para la obtención de grado.

A mi directora de tesis, Dra. Carolina Proaño Bolaños, por guiarme en el desarrollo de este proceso. Gracias por enseñarme, inspirarme y ayudarme a crecer.

Al Dr. Rafael de Almeida, por los consejos, los comentarios y las sugerencias aportadas en el desarrollo de este trabajo.

A los técnicos de investigación del laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, por la asistencia técnica brindada en los ensayos realizados y en el manejo de equipos.

Dedicatoria

A mis padres y a mis hermanos, quienes siempre han estado presente en cada momento de mi vida. Por ofrecerme ese apoyo incondicional en todo momento y por mi desarrollo a nivel de persona y académico.

A mis sobrinos, Sophia, Bárbara y John, por ser una fuente de inspiración.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria	v
Resumen	x
Abstract	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.1.1. Ventajas de los péptidos antimicrobianos	1
1.1.2. Mecanismo de acción.....	1
1.1.3. Péptidos antimicrobianos en anuros	1
1.1.4. Cruzioseptinas	2
1.1.5. Limitaciones de los péptidos antimicrobianos.....	2
1.1.6. Importancia del diseño y optimización de los péptidos antimicrobianos	3
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Justificación de la investigación	6
1.4. Objetivos de la investigación	6
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	7
2.1. Diseño de nuevos análogos de Cruzioseptina-1	7
2.2. Síntesis y caracterización de los análogos peptídicos	7
2.3. Purificación de los nuevos análogos y análisis por MALDI-TOF.....	8
2.4. Ensayos biológicos	8
2.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM)	8
2.4.2. Ensayo hemolítico.....	9
2.5. Cálculo del índice de selectividad (IS).....	9

2.6. Análisis <i>in silico</i>	10
2.6.1. Predicción de los sitios de clivaje en los péptidos por proteasas.....	10
2.6.2. Modelamiento de la estructura 3D	10
2.6.3. Dinámica molecular	10
2.6.4. Acoplamiento molecular.....	11
2.7. Análisis estadísticos	11
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	11
3.1. Diseño de nuevos análogos peptídicos.....	11
3.2. Caracterización de los péptidos sintéticos y purificación de [K4K15]CZS-1	13
3.3. Actividad antimicrobiana y hemolítica de los análogos de cruzioseptina 1.....	14
3.4. Índice de selectividad de los péptidos en contra de las bacterias	15
3.5. Predicción de los sitios de clivaje en la secuencia de los péptidos	15
3.6. Estructura tridimensional de los péptidos.....	16
3.7. Dinámica Molecular	17
3.8. Acoplamiento molecular.....	20
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	20
4.1. Actividad antimicrobiana y hemolítica de los péptidos.....	20
4.2. Índice de selectividad.....	22
4.3. Análisis <i>in silico</i>	22
4.4. Escisión de los péptidos por las proteasas. Un enfoque <i>in silico</i>	23
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
REFERENCIAS	25

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de rueda helicoidal de a) CZS-1[6-20], b) [K8K10] y c) [K4K15]CZS-1.	13
Figura 2. Cromatograma y espectro de masas de [K4K15]CZS-1 después de la purificación por cromatografía flash.....	13
Figura 3. Actividad hemolítica de [K4K15]CZS-1.....	15
Figura 4. Modelos tridimensionales de a) CZS-1[6-20], b) [K8K10] y c) [K4K15]CZS-1 obtenidos mediante I-TASSER y gráfico de Ramachandran visualizado mediante BIOVA Discovery Studio.	17
Figura 5. Imágenes de la estructura tridimensional de CZS-1[6-20] (en celeste), [K8K10] (en morado) y [K4K15]CZS-1 (en rojo) durante 10 nanosegundos.	18
Figura 6. Representación gráfica del RMSD proveniente de las simulaciones de dinámica molecular en agua..	19
Figura 7. Representación gráfica del RMSD proveniente de las simulaciones de dinámica molecular en SDS.....	19
Figura 8. Interacciones de acoplamiento molecular entre [K4K15]CZS-1 (color celeste) y la membrana bacteriana.	20

Índice de Tablas

Tabla 1. Bioactividad de las cruzioseptinas	2
Tabla 2. Secuencia de los análogos peptídicos de Cruzioseptina 1.....	7
Tabla 3. Sistemas péptido-agua y péptido-SDS generado por el servidor CHARMM-GUI..	11
Tabla 4. Análogos peptídicos basados en Cruzioseptina 1.....	12
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos derivados de Cruzioseptina 1.	12
Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los análogos de cruzioseptina 1.....	14
Tabla 7. Predicción de los sitios de corte por proteasas en la secuencia de los péptidos..	16

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos representa una grave amenaza para la salud mundial. En la última década, los péptidos antimicrobianos emergen como una alternativa para combatir esta problemática mundial. En este contexto, cruzioseptina 1, un péptido aislado de *C. calcarifer*, es considerado como un agente antimicrobiano novedoso por su alta potencia antimicrobiana en contra de patógenos bacterianos. Sin embargo, este péptido presenta una actividad hemolítica moderada. Con el objetivo de reducir la toxicidad y aumentar la potencia, se diseñaron y evaluaron 3 análogos peptídicos basados en cruzioseptina 1. [K4K15]CZS-1, un análogo con cationicidad aumentada e hidrofobicidad reducida, presentó un alto efecto antimicrobiano en contra de *S. aureus* (CIM = 4 mg/L) y *E. coli* (CIM = 8 mg/L). Además, indujo menor hemólisis en comparación a cruzioseptina-1. Adicionalmente, mediante estudios *in silico* se propone que la membrana bacteriana es el blanco terapéutico de [K4K15]CZS-1. Por lo tanto, estos resultados proveen evidencias que [K4K15]CZS-1 podría ser considerado como una opción prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

Palabras claves: Péptidos antimicrobianos, diseño de péptidos, actividad antimicrobiana, hemólisis, resistencia antimicrobiana

Abstract

Antimicrobial resistance represents a serious threat to global health. In the last decade, antimicrobial peptides have emerged as an alternative to combat this global problem. In this context, cruzioseptin 1, a peptide isolated from *C. calcarifer*, is considered a novel antimicrobial agent for its high antimicrobial potency against bacterial pathogens. However, this peptide has moderate hemolytic activity. In order to reduce toxicity and increase antimicrobial potency, 3 peptide analogues based on cruzioseptin 1 were designed and evaluated. [K4K15]CZS-1, an analogue with increased cationicity and reduced hydrophobicity, had a high antimicrobial effect against *S. aureus* (MIC = 4 mg/L) and *E. coli* (MIC = 8 mg/L). In addition, it induced less hemolysis compared to cruzioseptin-1. Additionally, *in silico* studies propose that the bacterial membrane is the therapeutic target of [K4K15]CZS-1. Therefore, these results provide evidence that [K4K15]CZS-1 could be considered as a promising candidate for the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Antimicrobial peptides, peptide design, antimicrobial activity, hemolysis, antimicrobial resistance.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Ventajas de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos presentan varias ventajas en comparación a las pequeñas moléculas terapéuticas como la síntesis automatizada y estandarizada. Otra virtud es que son menos propensos a causar toxicidad e inmunogenicidad [1,2]. En el caso de los péptidos antimicrobianos, estos poseen características únicas que los convierten en agentes antimicrobianos esperanzadores para combatir la resistencia a los antimicrobianos. Por ejemplo, la actividad antimicrobiana en el rango micromolar y la baja toxicidad en la concentración que inhibe a los patógenos. Además, presentan una actividad de amplio espectro contra bacterias (incluyendo multirresistentes), hongos, parásitos, células cancerosas y virus [3–7]. Mientras que, por su mecanismo de acción estos péptidos tienen baja probabilidad para desarrollar resistencia [3–6,8].

1.1.2. Mecanismo de acción

Los péptidos antimicrobianos presentan un mecanismo de acción distinto a los antibióticos comerciales. Hasta la fecha, se han propuesto dos tipos de blancos moleculares que tienen los péptidos: (1) interacción con la membrana del patógeno o (2) dianas intracelulares. Para el primero, la carga catiónica del péptido permite que haya una atracción electrostática entre el péptido antimicrobiano y la membrana bacteriana cargada negativamente. Posteriormente, la región hidrofóbica del péptido induce la inserción en la membrana del patógeno, produciendo una rápida muerte del microorganismo patógeno. Mientras que, para el otro mecanismo de acción propuesto, el péptido ingresa a la célula sin disrupción de la membrana e inhibe funciones intracelulares esenciales como la síntesis de proteínas funcionales o síntesis de ADN y ARN [5,8,9].

1.1.3. Péptidos antimicrobianos en anuros

Las secreciones de la piel de muchas especies de anuros constituyen una fuente rica de péptidos antimicrobianos con un amplio espectro de acción. Se ha evidenciado que estos péptidos tienen actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica, anticancerígena y antiparasitaria [10,11]. Hasta el 2015, se han identificado alrededor de 1900 PAMs a partir de las secreciones cutáneas de 178 especies pertenecientes a 28 géneros de anfibios [12].

Estos péptidos bioactivos presentan una longitud de 8-63 residuos de aminoácidos. Además de ser catiónicos (carga neta de +2 a +6 a pH 7), contienen aproximadamente un 50% de aminoácidos hidrofóbicos [7,11]. Una de las clasificaciones de los péptidos antimicrobianos es de acuerdo a la similitud en la secuencia de aminoácidos, describiéndose alrededor de 100 familias en anuros [12]. Entre las que destacan: phylloseptinas, dermaseptinas, picturinas, phylloxinas, plasticinas y cruzioseptinas [7,11].

1.1.4. Cruzioseptinas

Las cruzioseptinas son una familia de péptidos antimicrobianos (PAMs) reportados en la secreción de la piel de *Cruziophyla calcarifer* en 2016. Hasta la actualidad se han identificado 17 cruzioseptinas. Estos péptidos son catiónicos y anfipáticos con una longitud de 20-32 residuos de aminoácidos. Se caracterizan por presentar una secuencia N-terminal conservada GFLD- y las secuencias de motivos –VALGAVSK o GKAAK(N/G/S) (V/A)V en la mitad del péptido. Estos péptidos tienen actividad antimicrobiana en contra de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, y *Leishmania* spp. (Tabla 1). La cruzioseptina-1 (CZS-1) ha demostrado ser el péptido más potente de esa familia hasta el momento [7,13,14].

Tabla 1. Bioactividad de las cruzioseptinas

Péptido	Secuencia	Activo en contra de	Ref.
CZS-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Leishmania</i> spp.	[7,13]
CZS-2	GFLDVIKHVGKAAALGVVTHLINQ	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Leishmania</i> spp.	[7,13]
CZS-3	GFLDVVKHIGKAAALGAVTHLING	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Leishmania</i> spp.	[7,13]
CZS-16	GFLDVLKGVGKAAALGAVTHLINQ	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> .	[14]
CZS-17	GFLDVVKGVGKAAALGAVTHLINQ	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> .	[14]

1.1.5. Limitaciones de los péptidos antimicrobianos

Algunos péptidos antimicrobianos que presentan una alta actividad antimicrobiana y una baja citotoxicidad se encuentran bajo ensayos clínicos para el tratamiento en contra de diferentes infecciones [15,16]. Por ejemplo, Pexiganan, un análogo de magainina, está

siendo evaluado para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético [15]. Sin embargo, varias limitaciones pueden obstaculizar su desarrollo como nuevo agente terapéutico. Entre ellas se encuentran (i) la baja estabilidad del péptido debido a la degradación enzimática, (ii) citotoxicidad, (iii) la entrega ineficiente de las concentraciones del péptido al sitio objetivo, (iv) alto costo en su producción o (v) la disminución o abolición de la actividad antimicrobiana del péptido al estar presente en condiciones fisiológicas [17–20]. Por lo tanto, se deben superar estas limitaciones para su desarrollo exitoso como fármaco.

1.1.6. Importancia del diseño y optimización de los péptidos antimicrobianos

La gran diversidad de secuencias de péptidos antimicrobianos naturales ha proporcionado datos claves en cuanto a estructura y función para la creación de una nueva generación de péptidos antimicrobianos sintéticos con mayor actividad antimicrobiana y menor toxicidad [18]. Además, se pueden diseñar péptidos resistentes a proteasas [21,22]. A continuación, se detallan varias herramientas que permiten optimizar a los péptidos antimicrobianos.

Bibliotecas sintéticas

Consiste en la síntesis y cribado antimicrobiano de alrededor de 1000 péptidos. En ese sentido, se considera una herramienta ampliamente usada para la optimización rápida de péptidos bioactivos. Sin embargo, una de las desventajas de esta tecnología es que al ser bibliotecas grandes representan un mayor costo en su producción más aún cuando se analiza un cribado posicional de cada uno de los aminoácidos o un enfoque iterativo [23].

Métodos computacionales para el diseño de PAMs

Las diferentes bases de datos de péptidos antimicrobianos disponibles gratuitamente: APD3 [24], YADAMP [25], CAMP_{R3} [26], BaAMPs [27], han permitido el diseño de nuevos péptidos sintéticos [20,23]. Debido a que se han desarrollado varias herramientas informáticas a partir de redes neuronales, estudios de relación estructura-actividad, algoritmos genéticos, e inteligencia artificial, se ha logrado predecir y optimizar péptidos antimicrobianos sintéticos que presenten un mayor índice terapéutico [23].

Mutagénesis sitio dirigida

Este enfoque permite diseñar al nuevo péptido mediante la sustitución, deleción o añadiendo uno o más aminoácidos. Esto nos permite la fácil comprensión del efecto funcional en el péptido molde e identificar nuevos análogos con índice terapéutico mejorado [23].

1.1.6.1. Modificaciones y sustituciones de aminoácidos para mejorar la actividad antimicrobiana

Análogos de Lys

La construcción de análogos con modificaciones en la cadena lateral del aminoácido lisina aumentan la actividad antimicrobiana con respecto al péptido antimicrobiano que contiene lisina sin modificar. Por ejemplo: Los análogos Tritrp–Dab y Tritrp–Dap, reducción de 2 y 3 carbonos respectivamente, potenciaron hasta 4 veces más la actividad antimicrobiana [28].

Aumento de la cationicidad del péptido

El diseño de análogos con sustituciones de aminoácidos neutros y aminoácidos no polares por aminoácidos cargados positivos potencian la actividad antimicrobiana. Por ejemplo: El análogo L-K6 con una carga neta de +7 tuvo como resultado una actividad antimicrobiana hasta 40 veces mayor en comparación del péptido Temporin-1CEb, con carga neta de +1 [4].

1.1.6.2. Modificaciones y sustituciones de aminoácidos para reducir hemólisis

Análogos con menor hidrofobicidad

Análogos peptídicos menos hidrofóbicos con una distribución separada de aminoácidos cargados positivos conlleva a una reducción en la hemólisis. Por ejemplo: El péptido sintético 3K-F17-3K, el cual presentaba 3 lisinas en sus extremos y una reducción de la hidrofobicidad (reducción de 3.14 a 1.48 con respecto a sus análogos) no presentó hemólisis, incluso cuando este péptido antimicrobiano se probó en altas concentraciones (320 μ M) [29].

Reducción en la longitud de la secuencia

Los análogos que presentaron una reducción en la longitud de la secuencia mostraron una menor citotoxicidad hacia los glóbulos rojos. Por ejemplo: el péptido DMPC-19, generado a partir de la delección de 9 aminoácidos de la secuencia del péptido DMPC, presentó una hemólisis menor al 10% a la concentración de 256 μ M. Mientras que, DMPC presentó >80% de hemólisis en dicha concentración [30]. De igual manera sucedió con RPb, un segmento de 16 residuos de aminoácidos N-terminal, que redujo la toxicidad hacia eritrocitos en comparación del péptido molde Ranatuerin-2Pb [31].

1.2. Planteamiento del problema

En la actualidad existe una alta resistencia a los antimicrobianos por el uso excesivo e indebido de dichos fármacos tanto en el sector humano y sector animal. Esto ha permitido la aparición de microorganismos resistentes a múltiples fármacos a un ritmo acelerado [22,32,33]. A su vez ha provocado que los antibióticos se vuelvan menos efectivos para tratar las distintas enfermedades infecciosas, lo que resulta en un problema de salud mundial por las limitadas opciones de fármacos que existen actualmente. Provocando que aquellas infecciones que antes eran tratables lleguen a producir incluso la muerte [33].

Una opción para combatir la resistencia antimicrobiana son los péptidos antimicrobianos. Estas moléculas se han aislado de distintas especies pertenecientes a los 6 reinos de la naturaleza y han mostrado una diversidad de funciones biológicas como: actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica, anticancerígena y moduladora de la respuesta inmune [7,8,15,16,34]. Además, algunos péptidos antimicrobianos inducen baja toxicidad hacia el hospedador y presentan un novedoso mecanismo de acción el cual desintegra la membrana bacteriana. Este último punto hace que las bacterias no desarrollen resistencia fácilmente debido a que es energéticamente desfavorable la producción de una nueva bicapa lipídica [5,8,16].

Por las ventajas que se mencionan anteriormente, los péptidos antimicrobianos son considerados como candidatos prometedores a agentes antimicrobianos capaces de reemplazar a los antibióticos convencionales [16]. Sin embargo, la mayoría de estas moléculas no superan la fase preclínica debido a la baja estabilidad metabólica, toxicidad no deseada en las células hospedadoras, pérdida de actividad antimicrobiana en condiciones fisiológicas o degradación proteolítica [34–36].

1.3. Justificación de la investigación

Los péptidos antimicrobianos han sido ampliamente estudiados y considerados como novedosos agentes antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En comparación a los antibióticos, estas moléculas tienen un rápido efecto y amplio espectro de acción. Además, inducen baja tasa de resistencia [37]. Hasta la fecha, alrededor de 3000 péptidos antimicrobianos han sido aislados y caracterizados funcionalmente. Sin embargo, solo 7 han sido aprobados por la FDA para su uso clínico, mientras que, otros 12 péptidos antimicrobianos están siendo evaluados en las diferentes fases clínicas [35,37,38]. Por lo tanto, se evidencia que esa transición hacia una aplicación terapéutica está siendo obstaculizada por ciertas limitaciones.

Los péptidos antimicrobianos, como cualquier otra molécula candidato a fármaco, deben superar ciertos desafíos incluyendo estabilidad del péptido, pérdida de actividad en condiciones fisiológicas relevantes y toxicidad [36]. Varias estrategias están siendo exploradas para superar estas limitaciones. Por ejemplo, el uso de aminoácidos no naturales, modificación del N-terminal o C-terminal conducen a una mejora en la estabilidad del péptido [18,39,40]. El aumento de la cationicidad incorporando arginina o lisina en la secuencia nativa aumenta la actividad antimicrobiana [41–43]. Mientras que reducir la longitud del péptido reduce la toxicidad en las células del hospedador y el costo de la síntesis [30,39]. Con esto en mente, se plantea diseñar nuevos análogos peptídicos con mayor potencia antimicrobiana y toxicidad reducida usando como arquetipo CZS-1. Debido a que CZS-1 es altamente activo en contra de patógenos e inducen baja hemólisis en la concentración mínima inhibitoria.

1.4. Objetivos de la investigación

Objetivo General

Diseñar un análogo de Cruzioseptina 1 (CZS-1) que presente actividad antimicrobiana más potente y hemólisis reducida.

Objetivos Específicos

- Diseñar, sintetizar y purificar al menos 3 análogos de CZS-1.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de los análogos de CZS-1.
- Establecer la actividad hemolítica de los análogos de CZS-1.
- Determinar el mecanismo de acción mediante herramientas *in silico*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Diseño de nuevos análogos de Cruzioseptina-1

Cruziopseptina 1 (CZS-1) [7] fue usado como arquetipo para diseñar análogos más potentes y menos tóxicos. En resumen, se investigó el efecto del incremento de cationicidad, reducción o aumento de la hidrofobicidad y la reducción de la longitud del péptido en la actividad antimicrobiana y toxicidad de los nuevos análogos (Tabla 2). Los nuevos análogos peptídicos fueron evaluados mediante herramientas *in silico* como iAMPred [44] (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/index.html>) para evaluar la actividad antimicrobiana, HemoPI (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/hemopi/index.php>) para predecir la actividad hemolítica y ToxinPred [45] para predecir la toxicidad. Finalmente, las propiedades fisicoquímicas y el diagrama de rueda helicoidal fueron obtenidas mediante HELIQUEST [46].

Tabla 2. Secuencia de los análogos peptídicos de Cruzioseptina 1

Péptido	Secuencia ^a	Referencia
CZS-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	[7]
[K4K15]CZS-1	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	
CZS-1[6-20]	VKGVGKVALGAVSKL	
[K8K10]	VKGVGKV KL KAVSKL	

^aTodos los péptidos son amidados en el C-terminal. Los diferentes aminoácidos de [K8, K10] en comparación a CZS-1[6-20] son subrayados en rojo. Mientras que, los diferentes aminoácidos de [K4K15]CZS-1 en comparación a CZS-1 se marcaron con negrita.

2.2. Síntesis y caracterización de los análogos peptídicos

La síntesis de péptido se realizó mediante síntesis química en fase sólida usando la estrategia FMOC en un sintetizador automático de péptidos por microondas (CEM Corporation). La resina usada fue Fmoc Rink amide (HL), para la desprotección de los grupos aminos se usó piperidina 20%, para la activación se usó diisopropilcarbodiimida (DIC) y Oxyma base. Después de cada etapa de desprotección y acoplamiento se realizó un lavado con Dimetilformamida (DMF). Una vez sintetizado todo el péptido se escindió del soporte sólido y se eliminaron todos los grupos protectores mediante una solución ácida de 92.5% ácido trifluoroacético, 2.5% agua, 2.5% triisopropil silano, 2.5% 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol

(DODT). Luego, el péptido se precipitó con éter dietílico. Posteriormente, se liofilizó a -80 °C.

Por otro lado, la pureza de los péptidos fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (Waters) acoplado a una columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) con un detector dual UV-VIS en el rango de 214 nm y 280 nm. En resumen, se pesó 1.5 mg de péptido crudo y se disolvió en 500 µl de la solución agua con ácido trifluoroacético (99.95/0.05 v/v). La separación se realizó mediante un gradiente lineal desde 70% fase móvil A (agua 99.95%, ácido trifluoroacético 0.05%) a 100% fase móvil B (acetonitrilo 99.95% y ácido trifluoroacético 0.05%) con un flujo de 1mL/min durante 40 minutos. Además, se corroboró la masa molecular mediante MALDI-TOF MS (Axima Confidence, Shimadzu). Para lo cual se colocó 1 µl de matriz α -CHCA (10mg/mL) y 1 µl de la muestra. Se requiere una pureza mayor a 80% para realizar los ensayos antimicrobianos.

2.3. Purificación de los nuevos análogos y análisis por MALDI-TOF

La purificación de [K4K15]CZS-1 se realizó mediante cromatografía flash (BUCHI) usando una columna C18 (60 x 12 mm, 40 µm, 4g) y un detector en el rango de 214 nm. En resumen, se diluyó 10 mg del péptido en 800 µl de la solución agua con ácido trifluoroacético (99.95/0.05 v/v). Posteriormente, se filtró en una membrana de 0.45 µm. La separación se realizó mediante un gradiente lineal desde 95% fase móvil A (agua 99.9%, ácido trifluoroacético 0.1%) a 100% fase móvil B (acetonitrilo 99.9%, ácido trifluoroacético 0.1%) con un flujo de 2.5mL/min durante 25 minutos. El péptido purificado se liofilizó a -80° C durante 3 días y la pureza se analizó con la metodología mencionada anteriormente, en la sección 2.2.

2.4. Ensayos biológicos

2.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM)

La concentración mínima inhibitoria de los péptidos sintéticos se determinó contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Candida albicans* (aislado clínico). En resumen, se realizaron diluciones seriadas de cada péptido en DMSO hasta obtener concentraciones de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 mg/L. Los microorganismos fueron cultivados en Mueller Hinton Broth hasta obtener 10⁶ UFC/ml.

Luego, las diluciones de los péptidos fueron mezcladas con la suspensión bacteriana y se colocó en una placa estéril de 96 pocillos. Como controles, se incluyeron DMSO en lugar del péptido sintético y caldo Mueller Hinton en diferentes pocillos. Se realizaron 5 réplicas por concentración de péptido y el experimento se realizó por duplicado. Las placas de 96 pocillos se incubaron a 37°C durante 18 horas. Cada placa se leyó a una absorbancia de 550 nm en un lector de microplacas (GloMax® Discover, Promega). La concentración mínima del péptido que no presentaba crecimiento inhibitorio se determinó como la concentración inhibitoria mínima (CIM). Finalmente, se tomaron 10 µl de cada concentración que no presentaba visualmente crecimiento y se cultivaron en placas que contenían agar Mueller Hinton. Se incubaron a 37°C durante 18 horas. La concentración mínima bactericida (CBM) se determinó como aquella concentración mínima donde no creció el microorganismo.

2.4.2. Ensayo hemolítico

La actividad hemolítica de los péptidos con actividad antimicrobiana se evaluó con las mismas concentraciones probadas en los ensayos antimicrobianos. En resumen, se incubaron 200 µl de una suspensión de glóbulos rojos al 2% de un donador humano sano (Tipo B+) con 200 µl de cada concentración de péptido (512-1 mg/L). Como control negativo se agregó buffer fosfato salino en lugar de péptido, y como control positivo se añadió una solución de buffer fosfato salino y Triton X-100 (2% v/v). Luego, se incubaron las muestras a 37°C durante 120 min. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de 96 pocillos. La lisis de los glóbulos rojos se analizó en el lector de microplacas (GloMax® Discover, Promega) a una absorbancia de 550 nm. El control positivo se considera como la concentración que produce el 100% de hemólisis.

2.5. Cálculo del índice de selectividad (IS)

Para determinar la selectividad de los péptidos en contra de las bacterias, el índice terapéutico fue calculado. Los valores del índice de selectividad fueron determinados mediante la relación entre CHM/GM. Donde CHM es la concentración que produce 10% de hemólisis y GM es la media geométrica de las concentraciones inhibitoria mínima en contra de las bacterias testeadas.

2.6. Análisis in silico

2.6.1. Predicción de los sitios de clivaje en los péptidos por proteasas

Se usó el programa *PeptideCutter* de ExPasy (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) para predecir los sitios de clivaje por las proteasas en la secuencia de los péptidos.

2.6.2. Modelamiento de la estructura 3D

La estructura tridimensional de los análogos peptídicos se obtuvieron mediante la herramienta I-TASSER y el modelo tridimensional obtenido se validó mediante un gráfico de Ramachandran [47].

2.6.3. Dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de los análogos peptídicos en dos disoluciones diferentes: i) agua y ii) SDS. Las moléculas que se usarán en cada sistema pueden observarse en la Tabla 2. Los archivos requeridos para la simulación serán generados mediante el servidor CHARMM-GUI y las simulaciones serán realizadas en Gromacs [48] con el campo de fuerza CHARMM [49–51]. Se agregarán iones Na^+ y Cl^- para simular las condiciones fisiológicas a una concentración de 0.15 M. Además, se usarán condiciones de contorno periódicas y electrostática Particle-Mesh-Ewald.

Por otro lado, el primer paso de la simulación será la minimización de energía utilizando el “steepest descent algorithm” y un parámetro de convergencia de menos de $10 \text{ kJ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$. Para el equilibrio, se ejecutará dos simulaciones de conjuntos NVT y NPT de 500 ps cada una. Se utilizarán termostato Nose-Hoover a 310,15 K y barostato Parrinello-Rahman a 1 bar, respectivamente.

Los sistemas equilibrados se someterán a una simulación de 10 ns, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y presión descritas anteriormente. Cabe mencionar que las simulaciones son realizadas a 37°C permitiendo entender la estructura conformacional del péptido a la temperatura similar a los ensayos *in vitro*. Finalmente, las trayectorias finales obtenidas se analizarán utilizando las herramientas de Gromacs.

Tabla 3. Sistemas péptido-agua y péptido-SDS generado por el servidor CHARMM-GUI

Sistema	Modelo de agua	Campo de Fuerza
Péptido - 128 moléculas SDS	TIP3	CHARMM36
Péptido - Agua	TIP3	CHARMM36

2.6.4. Acoplamiento molecular

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular para determinar el posible blanco terapéutico de [K4K15]CZS-1. Con esto en mente, se mimetizó una membrana bacteriana el servidor CHARMM-GUI [49,50,52]. Este modelo contiene una bicapa lipídica con lípidos POPG y POPE en una proporción de 3: 1, respectivamente. Las estructuras tridimensionales de los péptidos a usar fueron las obtenidas en el paso 2.6. Finalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular entre la membrana bacteriana y el péptido utilizando Autodock VINA [53]. La energía de interacción entre la membrana y [K4K15]CZS-1 se expresó como afinidad (kcal / mol).

2.7. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey usando el programa estadístico GraphPad Prism 8. Los datos son presentados como promedios \pm desviación estándar. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Diseño de nuevos análogos peptídicos

En este estudio, el péptido antimicrobiano CZS-1 fue usado como arquetipo para diseñar tres nuevos análogos. Para estudiar el efecto de la reducción de la longitud del péptido en la actividad biológica, CZS-1[6-20] y [K8K10] fueron diseñados. CZS-1 [6-20], con una longitud de 15 aminoácidos, abarca la posición del aminoácido 6 hasta el aminoácido 20 del péptido CZS-1. Mientras que, [K8K10] presenta una doble sustitución en comparación a CZS-1 [6-20], donde la glicina fue reemplazada por lisina en la posición 8 y alanina fue reemplazada por lisina en la posición 10. Además, se diseñó [K4K15]CZS-1 para evaluar el efecto del aumento de la cationicidad en la actividad biológica. [K4K15]CZS-1, con una longitud de 21 aminoácidos, presenta una doble sustitución en comparación a CZS-1, donde se reemplazó el ácido aspártico en la posición 4 por lisina y la glicina en la posición 15 por lisina.

De acuerdo a las herramientas bioinformáticas (Tabla 4), los análogos peptídicos tienen una alta probabilidad de ser antibacteriano y antifúngico. Además, los análisis *in silico* predicen una baja probabilidad de inducir hemólisis y toxicidad. Por otro lado, los péptidos diseñados presentan mayor carga neta y menor hidrofobicidad (Tabla 5). El diagrama de rueda helicoidal muestra que los péptidos son anfipáticos (Figura 1). Con esto en mente, los 3 péptidos fueron sintetizados para su evaluación *in vitro* y caracterización estructural.

Tabla 4. Análogos peptídicos basados en Cruzioseptina 1.

Péptido	iAMPred		HemoPi	ToxinPred
	Antibacterial	Antifúngico		
CZS-1[6-20]	0.97	0.83	0.46	No tóxico
[K8K10]	0.98	0.87	0.50	No tóxico
[K4K15]CZS-1	1	1	0.44	No tóxico

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos derivados de Cruzioseptina 1. Hidrofobicidad, momento hidrofóbico, carga a pH 7, y longitud fueron determinadas mediante Heliquist.

Péptido	Masa (Da)	Hidrofobicidad	Momento Hidrofóbico	Carga a pH 7	Longitud (aa)	Ref.
CZS-1	2117.60	0.581	0.472	+3	21	[7]
CZS-1[6-20]	1424.79	0.393	0.435	+4	15	
[K8K10]	1553.01	0.240	0.410	+6	15	
[K4K15]CZS-1	2201.8	0.523	0.528	+6	21	

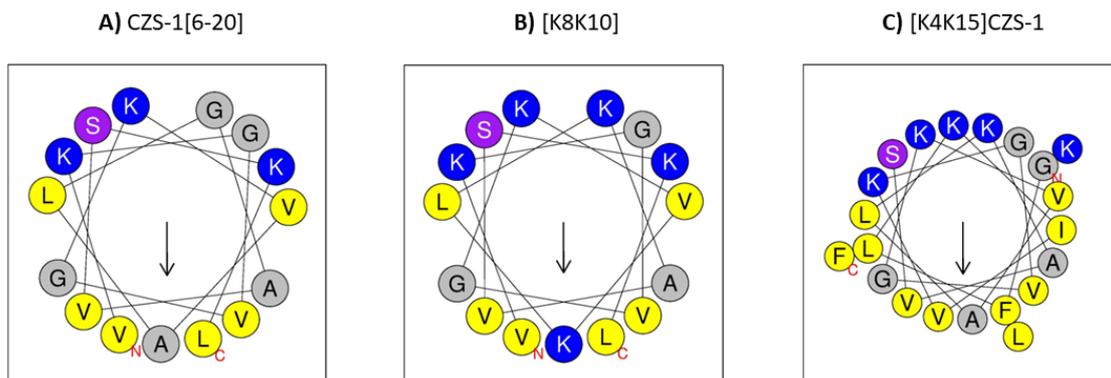


Figura 1. Diagrama de rueda helicoidal de a) CZS-1[6-20], b) [K8K10] y c) [K4K15]CZS-1. Residuos básicos se muestran en color azul, residuos no polares en amarillo y residuos polares en morado. Residuos no cargados como alanina y glicina están en gris.

3.2. Caracterización de los péptidos sintéticos y purificación de [K4K15]CZS-1

La pureza de los péptidos posterior a la síntesis fue: 59.76% para CZS-1[6-20], 80.57% para [K8K10] y 51.60% para [K4K15]CZS-1 (Anexo 1, 2 y 3). Además, se corroboró la identidad molecular de estos péptidos mediante el espectro de masas obtenido en comparación con la masa teórica calculada (Anexo 1, 2 y 3; Tabla 5). Después de la purificación de [K4K15]CZS-1 mediante cromatografía flash, el porcentaje de pureza fue analizado por cromatografía líquida de fase reversa y mostró una pureza de 97.55% (Figura 2).

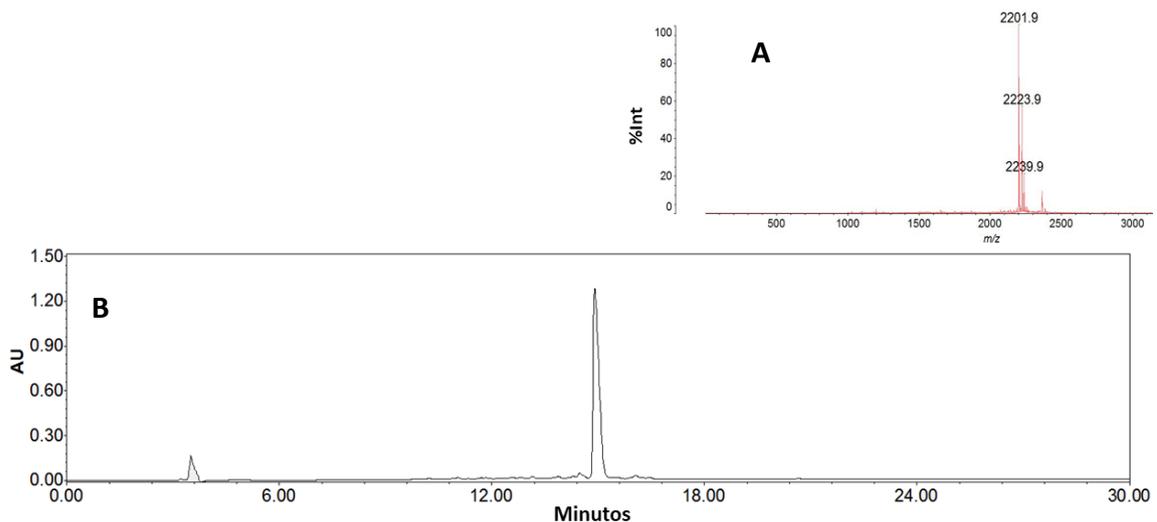


Figura 2. A) Espectro de masas y b) cromatograma de [K4K15]CZS-1 después de la purificación por cromatografía flash. [K4K15]CZS-1 tuvo un tiempo de retención de 14.90 minutos y una pureza de 97.55%.

Ensayos biológicos

3.3. Actividad antimicrobiana y hemolítica de los análogos de cruzioseptina 1

La actividad antimicrobiana de los péptidos fue determinada en contra de *E. coli*, *S. aureus*, y *C. albicans* (Tabla 6). CZS-1[6-20] y [K8K10] no mostraron actividad en contra de los tres microorganismos testeados. Mientras que, [K4K15]CZS-1 presentó una potente actividad antimicrobiana con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 8 mg/L (3.63 μ M) para *E. coli*, 4 mg/L (1.81 μ M) para *S. aureus*, y 32 mg/L (14.53 μ M) para *C. albicans*. Además, este péptido tuvo una concentración bactericida mínima (CBM) de 16 mg/L (7.26 μ M) para las bacterias testeadas y 128 mg/L (58.13 μ M) para *C. albicans*.

Por otro lado, [K4K15]CZS-1 mostró una actividad hemolítica menor al 10% en la concentración que inhibía a la bacteria Gram positiva y Gram negativa. (Figura 3).

Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los análogos de cruzioseptina 1. Péptidos sintéticos fueron evaluados en contra de una bacteria Gram positiva, bacteria Gram negativa y una levadura.

Péptido	CIM [CBM] mg/L			GM ^a	CHM ^b	IS ^c	Ref.
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i>				
CZS-1	32 [32]	8 [16]	8 [32]	20	16	0.8	[7]
CZS-1[6-20]	>1024 [ND]	>1024 [ND]	>1024 [ND]	ND	ND	ND	
[K8K10]	>1024 [ND]	>1024 [ND]	>1024 [ND]	ND	ND	ND	
[K4K15]CZS-1	8 [16]	4[16]	32 [128]	6	32	5.33	

^a La media geométrica de las CIM del péptido (GM) frente a las bacterias testeadas. ^b CHM se define como la concentración hemolítica mínima que causa el 10% de hemolisis en los eritrocitos. ^c El índice de selectividad (IS) se define como el radio entre CHM y GM. Valores más alto de IS indican mayor selectividad del péptido. ND significa no determinado.

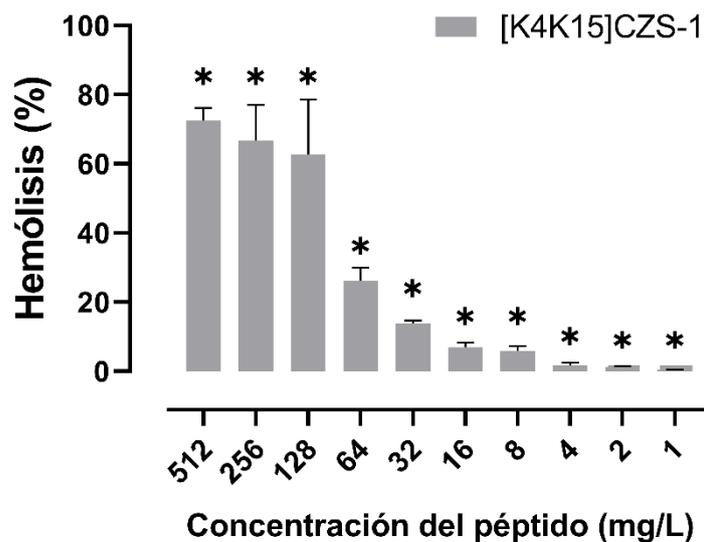


Figura 3. Actividad hemolítica de [K4K15]CZS-1. [K4K15]CZS-1 induce una hemólisis menor al 10% en la concentración que inhibe a las bacterias. El control positivo (Tritón X-100) fue considerado como el 100% de hemólisis. (*) Existe una diferencia significativa comparado al control positivo determinado por ANOVA ($p < 0.001$).

3.4. Índice de selectividad de los péptidos en contra de las bacterias

Como se mencionó anteriormente, el péptido cruzioseptina 1, es un péptido con alta actividad antimicrobiana y actividad hemolítica moderada. Por lo tanto, el índice de selectividad en contra de las bacterias es bajo (Tabla 6). Caso contrario sucedió con [K4K15]CZS-1, un análogo con cationicidad aumentada e hidrofobicidad reducida, donde mostró una selectividad mejorada con un valor de 5.33

Análisis *in silico*

3.5. Predicción de los sitios de clivaje en la secuencia de los péptidos

Los péptidos al estar constituidos de aminoácidos son vulnerables a las proteasas. De acuerdo a la Tabla 7, CZS-1[6-20] probablemente es escindida por tripsina en los residuos 2, 6 y 14. [K8K10] es escindida por tripsina en cinco sitios y por quimiotripsina en un sitio de corte. Mientras que, [K4K15]CZS-1 es clivada por tripsina y quimiotripsina en 5 y 3 sitios de corte, respectivamente.

Tabla 7. Predicción de los sitios de corte por proteasas en la secuencia de los péptidos.

Los péptidos fueron analizados en contra de una proteasa bacteriana y dos proteasas con funciones similares a aquellas localizadas en los distintos fluidos del cuerpo.

Péptido	Posición del residuo del sitio de corte ^a		
	Tripsina	Quimiotripsina	Peptidasa estafilocócica I
CZS-1[6-20]	2,6,14	N	N
[K8K10]	2,6,8,10,14	9	N
[K4K15]CZS-1	4,7,11,15,19	2,3,14	N

^a Los sitios de cortes mostrados son aquellos con una probabilidad de >60%. N significa que la proteasa no escinde al péptido.

3.6. Estructura tridimensional de los péptidos

La estructura 3D de los péptidos fue modelada por I-TASSER (Figura 4). CZS-1[6-20] presenta una alfa hélice en su región N-terminal, mientras que los residuos aminoacídicos 6-15 muestran una estructura no definida. [K8K10] tiene una estructura no definida. Mientras que, [K4K15]CZS-1 forma una α -hélice.

Por otro lado, los modelos tridimensionales fueron analizados por el diagrama de Ramachandran (herramienta disponible en BIOVA Discovery Studio). Los resultados demuestran que los residuos de los péptidos se encuentran en las regiones favorables o permitidas, indicando la alta confiabilidad estructural de los modelos (Figura 4).

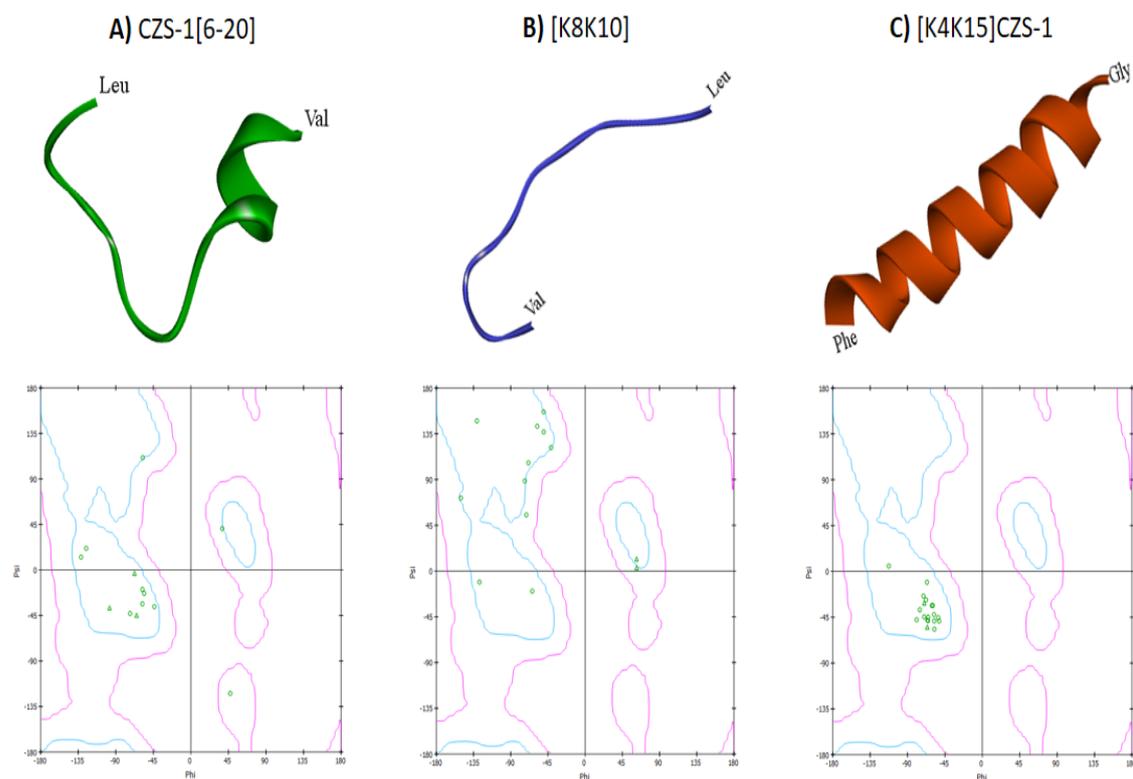


Figura 4. Modelos tridimensionales de a) CZS-1[6-20], b) [K8K10] y c) [K4K15]CZS-1 obtenidos mediante I-TASSER y gráfico de Ramachandran visualizado mediante BIOVA Discovery Studio. CZS-1[6-20] tiene una estructura α -helicoidal en el N-terminal, [K8K10] muestra una estructura no definida y [K4K15]CZS-1 presenta una estructura α -helicoidal.

3.7. Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas para una mejor comprensión del comportamiento de la estructura tridimensional de los péptidos sea en agua o SDS (Figura X). CZS-1[6-20] y [K8K10] en ambos ambientes mostraron una estructura no definida durante los 10 nanosegundos (Figura 5). Además, los análisis de RMSD indican que las estructuras de ambos péptidos en ambas soluciones se mantienen estable a lo largo de la simulación (Figura 6, 7). Mientras que, [K4K15]CZS-1 pierde una parte de su estructura α -helicoidal en el sistema acuoso formando una estructura no definida en el C-terminal. Caso contrario, sucedió en la micela de SDS donde conserva su estructura tridimensional. Además, los análisis RMSD revelan una alta estabilidad del péptido en la micela SDS (Figura 7).

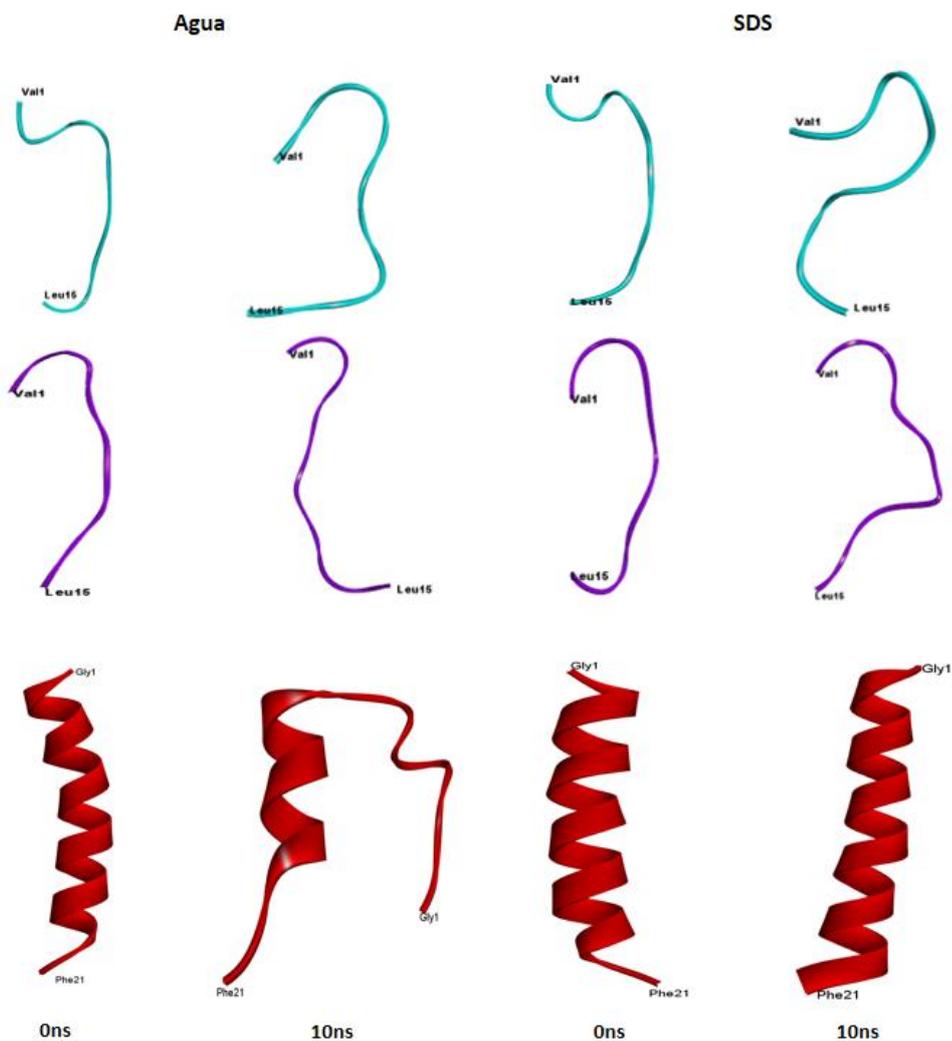


Figura 5. Imágenes de la estructura tridimensional de CZS-1[6-20] (en celeste), [K8K10] (en morado) y [K4K15]CZS-1 (en rojo) durante 10 nanosegundos. Se analizó en agua y SDS. CZS-1[6-20] y [K8K10] presenta una estructura no definida durante los 10 nanosegundos en ambas soluciones. Mientras que, [K4K15]CZS-1 mantiene su estructura α -helicoidal en el ambiente de SDS.

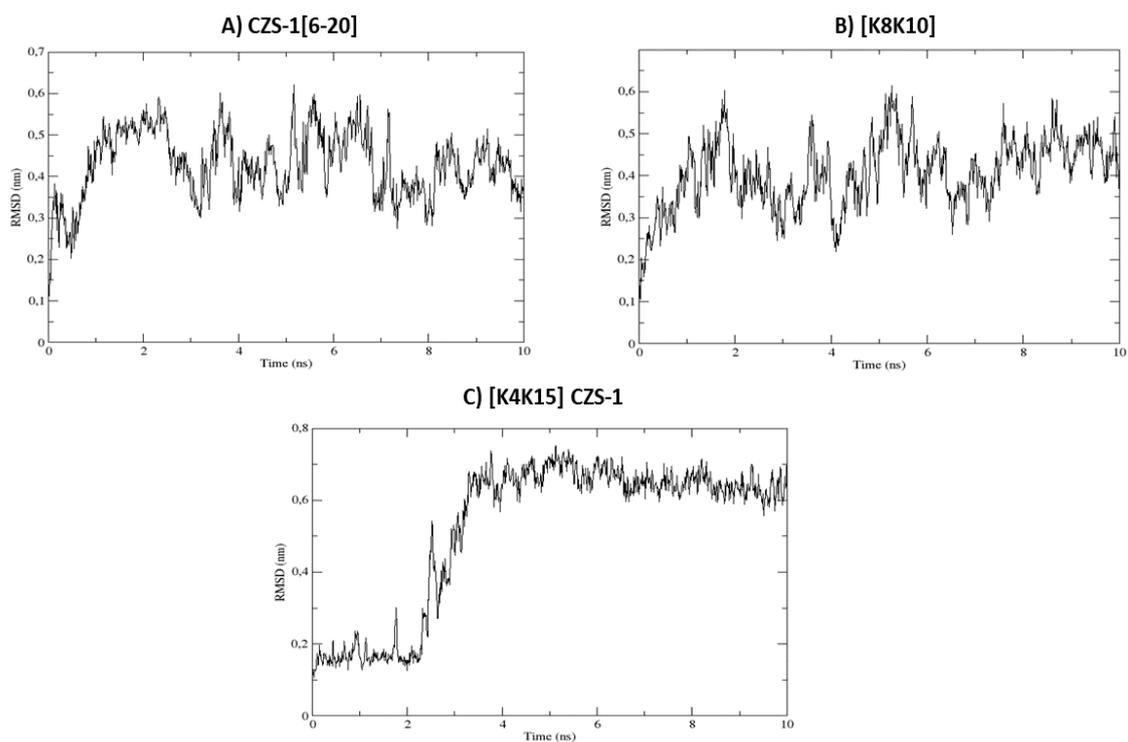


Figura 6. Representación gráfica del RMSD proveniente de las simulaciones de dinámica molecular en agua. A) CZS-1[6-20], B) [K8K10] y C) [K4K15]CZS-1.

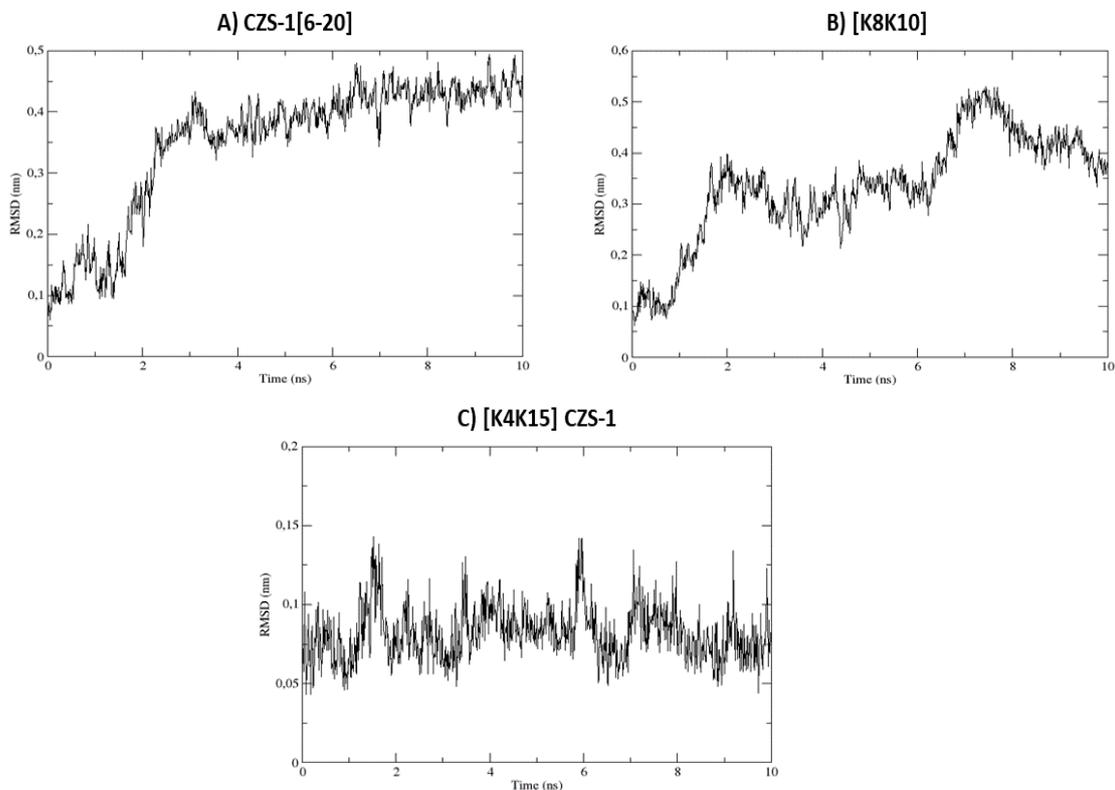


Figura 7. Representación gráfica del RMSD proveniente de las simulaciones de dinámica molecular en SDS. A) CZS-1[6-20], B) [K8K10] y C) [K4K15]CZS-1.

3.8. Acoplamiento molecular

El estudio de acoplamiento molecular muestra que existe una interacción y una alta afinidad entre [K4K15]CZS-1 y la membrana bacteriana mimetizada (Figura 8). El valor de docking del complejo péptido/membrana fue de -10.20 kcal/mol.

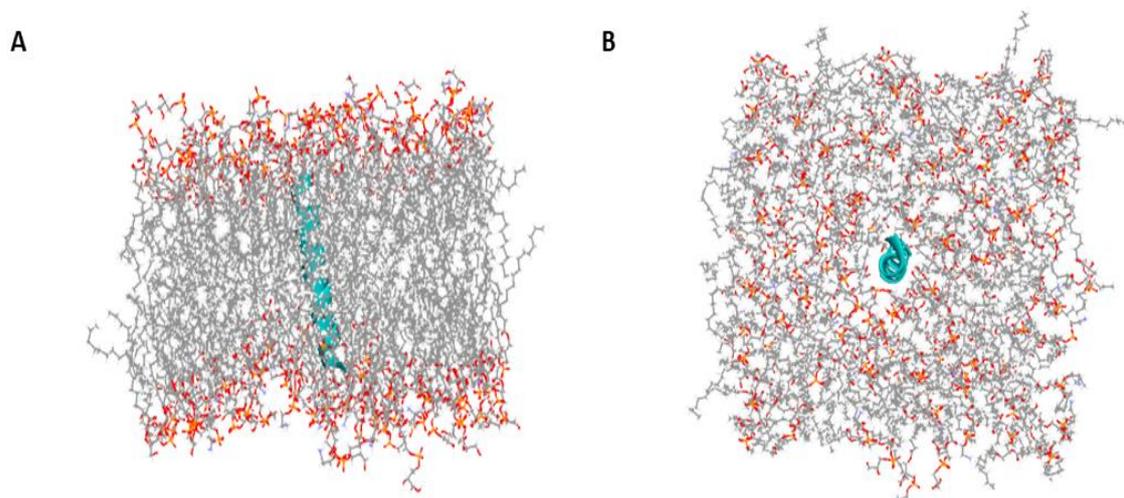


Figura 8. Interacciones de acoplamiento molecular entre [K4K15]CZS-1 (color celeste) y la membrana bacteriana. A) Vista lateral y b) vista superior del complejo péptido membrana. El valor de docking es de -10.20 kcal/mol.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antimicrobiana y hemolítica de los péptidos

El diseño racional de péptidos surge como una herramienta para mitigar las limitaciones, como toxicidad, pérdida de actividad en condiciones fisiológicas, degradación proteolítica, que impiden su desarrollo con miras a una aplicación terapéutica [30,54].

Cruzioseptina 1 (CZS-1), un péptido de 21 aminoácidos que fue aislado de *C. calcarifer*, por su alto efecto antimicrobiano puede ser considerado para el desarrollo como fármaco antibacteriano, antifúngico y leishmanicida. Por ejemplo, este péptido tuvo una concentración inhibitoria mínima de 8 mg/L para *S. aureus*, 32 mg/L para *E. coli* y 8 mg/L para *C. albicans*. Sin embargo, a la CIM más alta (32 mg/L) induce un 20% de hemólisis [7,13].

En este estudio, CZS-1 fue usado como arquetipo para diseñar nuevos análogos peptídicos con mayor selectividad entre células procariontas y eucarióticas. En cuanto a la actividad

antimicrobiana, iAMPPred predijo que los análogos diseñados tendrían una alta probabilidad de actividad en contra de bacterias y hongos. Sin embargo, los resultados revelaron que CZS-1[6-20] y [K8K10] no mostraron actividad antimicrobiana en contra de los patógenos testeados.

CZS-1[6-20] con una carga neta +4 y [K8K10] con una carga neta +6, presentaban semejanzas como la longitud de la secuencia (15 aminoácidos) y la remoción de GFLDI en el N-terminal y F en el C-terminal en comparación a CZS-1. Con esto en mente, se considera que estos aminoácidos podrían ser esenciales en la actividad antimicrobiana del péptido. En efecto, en nuestro laboratorio se sintetizó el péptido VKGVGKVKLKAVSKLF basado en [K8K10] con una fenilalanina añadida en el C-Terminal y mostró actividad antibacteriana en contra de *S. aureus* y *E. coli* (Anexos 4 y 5, datos no publicados). Varios autores han demostrado el importante rol que tiene la fenilalanina en la actividad antimicrobiana de los péptidos [55,56]. Por ejemplo, Lee y colaboradores [57] diseñaron análogos donde sustituían fenilalanina por alanina o lisina y estos mostraban una reducida actividad antimicrobiana en comparación al péptido nativo.

Por otro lado, el análogo de CZS-1 que presentaba un incremento en la cationicidad, [K4K15]CZS-1, mostró mayor potencia antimicrobiana en contra de *S. aureus* y *E. coli*. Este resultado fue similar a varios análogos que fueron diseñados a partir de péptidos de anfibios y escorpiones [42,43,58–61]. Probablemente, el aumento en la carga positiva del péptido conduciría a una mayor interacción con la membrana bacteriana con carga negativa [61,62]. Facilitando la permeabilización o disrupción de la membrana, lo que conlleva a la muerte de la bacteria. Además, la diferencia de la concentración inhibitoria mínima en las bacterias testeadas se debería a la composición de la membrana, la cual varía incluso en diferentes cepas de una misma especie [63].

Hoy en día, las infecciones fúngicas también son una gran amenaza para la salud humana debido a que se asocian con una alta tasa de morbilidad y mortalidad [64]. Siendo las especies de *Candida* las que producen el mayor número de casos a nivel mundial [65]. *C. albicans* es un patógeno oportunista que puede causar infecciones superficiales o sistémicas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos [66,67]. En este contexto, [K4K15]CZS-1 ejerció actividad en contra de *C. albicans*. Sin embargo, la concentración inhibitoria mínima fue dos veces menor en comparación de CZS-1. Probablemente, esta

reducción en la actividad se debe a la disminución de la hidrofobicidad en el análogo diseñado. Siendo este evento consistente en otros estudios previos [65,68].

La actividad hemolítica de los péptidos es considerada como uno de los principales obstáculos en el desarrollo como fármaco. En vista de esto, [K4K15]CZS-1 presentó un bajo efecto hemolítico (< 6%) en la concentración que inhibía a *E. coli* y *S. aureus*. Incluso en las concentraciones evaluadas (512-1 mg/L), este péptido induce una menor hemólisis en comparación a CZS-1. Este hallazgo se correlaciona a la hipótesis de varios autores, donde una reducción en la hidrofobicidad del péptido conlleva a una reducción en la actividad hemolítica [29,69,70]. Por otro lado, una terapia combinatoria sinérgica, (fármaco antimicrobiano comercial + péptido antimicrobiano), puede ser usada como una estrategia para reducir la toxicidad de los péptidos e incrementar el efecto antimicrobiano inhibiendo un amplio espectro de patógenos a través de diferentes mecanismos de acción [68,71]. Además, se ha evidenciado que esta estrategia combinatoria tuvo la capacidad de re-sensibilizar a *S. aureus* resistente a vancomicina y teicoplanina al efecto de vancomicina, teicoplanina y oxacilina [72].

4.2. Índice de selectividad

El índice de selectividad es un parámetro empleado para determinar la afinidad que tienen los péptidos. Este índice es obtenido mediante el cálculo de la actividad hemolítica sobre la concentración inhibitoria mínima, donde valores más altos nos indican una mayor especificidad en matar a los patógenos sin afectar a las células de mamíferos. De este modo, la reducción en la hidrofobicidad y el aumento de la carga catiónica de [K4K15]CZS-1 conllevó al incremento del índice de selectividad en más de 5 veces.

4.3. Análisis *in silico*

Los péptidos antimicrobianos se clasifican de acorde a su estructura secundaria en: α -hélice, hojas β , y estructura no definida (*random coil*) [34,73]. Los más estudiados son los α -hélice y se ha evidenciado que estos adoptan una conformación no definida en un ambiente acuoso; mientras que, en un ambiente similar a membrana adoptan una conformación α -hélice [74]. Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos α -hélice incluyen magaininas, temporinas y melitina [73]. En este sentido, las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas en condiciones similares a los ensayos *in vitro* para

entender el comportamiento de la estructura secundaria de los péptidos tanto en agua como en SDS durante 10 nanosegundos. Dando como resultado que, CZS-1[6-20] y [K8K10] adoptaban una conformación no definida en la solución acuosa y en la solución similar a membrana (SDS). Estos resultados podrían implicar la razón de la inactividad contra los patógenos testeados. Liu y colaboradores [75] argumentan que en un ambiente similar a membrana los péptidos antimicrobianos adoptan una conformación α -hélice permitiendo su inserción en la membrana bacteriana. Mientras que, [K4K15]CZS-1 en un ambiente acuoso mostraba que en la región C-terminal ningún elemento de la estructura secundaria era formado (α -hélice u hojas β), pero en SDS mantenía su estructura helicoidal. Este último resultado fue consistente a los presentados por Cardoso y colaboradores [76], sin embargo, el tiempo de simulación fue mucho mayor (100 nanosegundos).

Para un mejor desarrollo como alternativa a los antibióticos, el mecanismo de acción de estas moléculas debe ser elucidado. Por las propiedades fisicoquímicas del péptido, se hipotetiza que el mecanismo de acción de [K4K15]CZS-1 es la disrupción de la membrana bacteriana. En efecto, esta hipótesis se sustenta mediante con el resultado *in silico* de acoplamiento molecular. El valor negativo de energía de unión revela la gran afinidad que tiene [K4K15]CZS-1 con la membrana bacteriana (POPG: POPE 3:1). Este mismo mecanismo de acción ha sido propuesto y corroborado experimentalmente en varios péptidos antimicrobianos aislados de anfibios [77–79].

4.4. Escisión de los péptidos por las proteasas. Un enfoque *in silico*

La degradación proteolítica de los péptidos es otro impedimento que debe superarse para su éxito en el uso sistémico. Por ejemplo, existe una gran variedad de proteasas en los distintos fluidos del cuerpo (plasma sanguíneo, mucosa intestinal y tracto gastrointestinal) afectando la estabilidad del péptido y posteriormente la pérdida de la potencia antimicrobiana [36,59,80]. Acorde a los datos obtenidos *in silico*, tripsina y quimiotripsina tiene una probabilidad mayor al 60% de escindir a [K4K15]CZS-1 en 5 y 3 sitios, respectivamente. Esto se debe a que tripsina presenta una alta especificidad por arginina y lisina. En cambio, quimiotripsina reconoce y escinde residuos aromáticos [28]. Varias proteasas con una acción catalizadora similar a la tripsina, como carboxipeptidasa U (EC 3.4.17.20) o lisina carboxipeptidasa (EC 3.4.17.3), se encuentran en el plasma sanguíneo [81]. Además, las proteasas secretadas por patógenos bacterianos también afectan a los

péptidos antimicrobianos como aureolisina, peptidasa I o proteasa V8 secretada por *S. aureus* o elastasa secretada por *P. aeruginosa* [28,36]. Siendo este un mecanismo de resistencia que tienen las bacterias en contra de los péptidos antimicrobianos [82]. De este modo, el uso de aminoácidos no naturales, ciclación del péptido, acetilación del C-terminal, o incorporación con nanopartículas ayudarían a superar esta barrera [18,36].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El diseño racional de péptidos puede superar los obstáculos que presentan estas moléculas en su desarrollo como medicamento. En este estudio, el aumento de la cationicidad y la reducción de la hidrofobicidad permitió que [K4K15]CZS-1 muestre una mayor selectividad en matar a los patógenos bacterianos sin lisar a los eritrocitos humanos. Además, mediante estudios *in silico* se propone a la membrana bacteriana como el posible blanco molecular que tienen estas moléculas. En ese sentido, los futuros trabajos se deben concentrar en corroborar experimentalmente el mecanismo de acción que tiene [K4K15]CZS-1. Adicionalmente, la evaluación de la estabilidad y de la actividad antimicrobiana del péptido en condiciones fisiológicas relevantes.

REFERENCIAS

1. Henninot A, Collins JC, Nuss JM. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00318
2. Almeida JR, Palacios ALV, Patiño RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A 2 to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. *Drug Development Research*. 2019. doi:10.1002/ddr.21456
3. Mikut R, Ruden S, Reischl M, Breitling F, Volkmer R, Hilpert K. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858: 1024–1033. doi:10.1016/j.bbamem.2015.12.013
4. Shang D, Li X, Sun Y, Wang C, Sun L, Wei S, et al. Design of Potent, Non-Toxic Antimicrobial Agents Based upon the Structure of the Frog Skin Peptide, Temporin-1CEb from Chinese Brown Frog, *Rana chensinensis*. *Chem Biol Drug Des*. 2012. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01363.x
5. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 2013;6: 1543–1575. doi:10.3390/ph6121543
6. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*. 2019.
7. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016;146: 1–13. doi:10.1016/J.JPROT.2016.06.017
8. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*. 2018;8. doi:10.3390/biom8010004
9. Benfield AH, Henriques ST. Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms. *Front Med Technol*. 2020. doi:10.3389/fmedt.2020.610997

10. Kamech N, Vukičević D, Ladram A, Piesse C, Vasseur J, Bojović V, et al. Improving the Selectivity of Antimicrobial Peptides from Anuran Skin. *J Chem Inf Model*. 2012;52: 3341–3351. doi:10.1021/ci300328y
11. Michael Conlon J, Mechkarska M. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals*. 2014. doi:10.3390/ph7010058
12. Xu X, Lai R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. *Chem Rev*. 2015;115: 1760–1846. doi:10.1021/cr4006704
13. Mendes B, Proaño-Bolaños C, Gadelha FR, Almeida JR, Miguel DC. Cruzioseptins, antibacterial peptides from *Cruziohyla calcarifer* skin, as promising leishmanicidal agents. *Pathog Dis*. 2020. doi:10.1093/femspd/ftaa053
14. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021; 1–16. doi:10.1007/s00726-021-02986-w
15. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6: 194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
16. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol*. 2019;27: 323–338. doi:10.1016/J.TIM.2018.12.010
17. Casciaro B, Cappiello F, Cacciafesta M, Mangoni ML. Promising approaches to optimize the biological properties of the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH₂: Amino acids substitution and conjugation to nanoparticles. *Frontiers in Chemistry*. 2017. doi:10.3389/fchem.2017.00026
18. Ong ZY, Wiradharma N, Yang YY. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;78: 28–45. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.013

19. Liu S, Bao J, Lao X, Zheng H. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Sci Rep.* 2018. doi:10.1038/s41598-018-29566-5
20. Cardoso MH, Orozco RQ, Rezende SB, Rodrigues G, Oshiro KGN, Cândido ES, et al. Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? *Frontiers in Microbiology.* 2020. doi:10.3389/fmicb.2019.03097
21. Gonzáles-García M, San Juan-Galán J, Morales-Vicente F, Otero-Gonzales O. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Rev Cubana Med Trop.* 2017;69. Available: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/197/155>
22. Lyu Y, Yang Y, Lyu X, Dong N, Shan A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Sci Rep.* 2016. doi:10.1038/srep27258
23. Torres MDT, Sothiselvam S, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *J Mol Biol.* 2019. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015
24. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016. doi:10.1093/nar/gkv1278
25. Piotto SP, Sessa L, Concilio S, Iannelli P. YADAMP: Yet another database of antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents.* 2012. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.003
26. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 2016. doi:10.1093/nar/gkv1051
27. Di Luca M, Maccari G, Maisetta G, Batoni G. BaAMPs: The database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling.* 2015. doi:10.1080/08927014.2015.1021340
28. Arias M, Piga KB, Hyndman ME, Vogel HJ. Improving the activity of trp-rich antimicrobial peptides by Arg/Lys substitutions and changing the length of cationic

- residues. *Biomolecules*. 2018. doi:10.3390/biom8020019
29. Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem*. 2012. doi:10.1074/jbc.M111.303602
 30. Ying Y, Wang H, Xi X, Ma C, Liu Y, Zhou M, et al. Design of N-Terminal Derivatives from a Novel Dermaseptin Exhibiting Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9110646
 31. Zhou X, Shi D, Zhong R, Ye Z, Ma C, Zhou M, et al. Bioevaluation of ranatuerin-2Pb from the frog skin secretion of *Rana pipiens* and its truncated analogues. *Biomolecules*. 2019. doi:10.3390/biom9060249
 32. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *Journal of Antibiotics*. 2017. doi:10.1038/ja.2017.30
 33. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Report. 2014. doi:1.4.2014
 34. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
 35. Sarkar T, Chetia M, Chatterjee S. Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond. *Front Chem*. 2021;9: 432. doi:10.3389/fchem.2021.691532
 36. Ting DSJ, Beuerman RW, Dua HS, Lakshminarayanan R, Mohammed I. Strategies in Translating the Therapeutic Potentials of Host Defense Peptides. *Frontiers in Immunology*. 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.00983
 37. Rončević T, Puizina J, Tossi A. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019. p. 5713. doi:10.3390/ijms20225713
 38. Chen CH, Lu TK. Development and challenges of antimicrobial peptides for

- therapeutic applications. *Antibiotics*. MDPI AG; 2020. p. 24. doi:10.3390/antibiotics9010024
39. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research; 2020. pp. 311–332. doi:10.1038/s41573-019-0058-8
 40. Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, Boer L de, Zaat SAJ, Vogel HJ. Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS One*. 2010;5: 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0012684
 41. Gao Y, Wu D, Xi X, Wu Y, Ma C, Zhou M, et al. Identification and characterisation of the antimicrobial peptide, phylloseptin-PT, from the skin secretion of *Phyllomedusa tarsius*, and comparison of activity with designed, cationicity-enhanced analogues and diastereomers. *Molecules*. 2016;21: 1667. doi:10.3390/molecules21121667
 42. Tan Y, Chen X, Ma C, Xi X, Wang L, Zhou M, et al. Biological activities of cationicity-enhanced and hydrophobicity-optimized analogues of an antimicrobial peptide, dermaseptin-PS3, from the skin secretion of *phyllomedusa sauvagii*. *Toxins (Basel)*. 2018;10: 320. doi:10.3390/toxins10080320
 43. Li M, Xi X, Ma C, Chen X, Zhou M, Burrows JF, et al. A novel dermaseptin isolated from the skin secretion of *phyllomedusa tarsius* and its cationicity-enhanced analogue exhibiting effective antimicrobial and anti-proliferative activities. *Biomolecules*. 2019;9: 628. doi:10.3390/biom9100628
 44. Meher PK, Sahu TK, Saini V, Rao AR. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci Rep*. 2017. doi:10.1038/srep42362
 45. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GPS. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0073957
 46. Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008. doi:10.1093/bioinformatics/btn392

47. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010;5: 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
48. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun.* 1995;91: 43–56. doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E
49. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29: 1859–1865. doi:10.1002/jcc
50. Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput.* 2016;12: 405–413. doi:10.1021/acs.jctc.5b00935
51. Cheng X, Jo S, Lee HS, Klauda JB, Im W. CHARMM-GUI Micelle Builder for Pure/Mixed Micelle and Protein/Micelle Complex Systems. *J Chem Inf Model.* 2013;53: 2171–2180. doi:10.1021/ci4002684
52. Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. CHARMM-GUI membrane builder Toward Realistic Biological Membrane Simulations. *J Comput Chem.* 2014;35: 1997–2004. doi:10.1002/jcc.23702
53. Trott O, Olson A. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem.* 2009;31: 455–461. doi:10.1002/jcc
54. Deslouches B, Montelaro RC, Urish KL, Di YP. Engineered cationic antimicrobial peptides (eCAPs) to combat multidrug-resistant bacteria. *Pharmaceutics.* 2020. doi:10.3390/pharmaceutics12060501
55. Li X, Li Y, Peterkofsky A, Wang G. NMR studies of aurein 1.2 analogs. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006. doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.032
56. Dennison S, Harris F, Phoenix D. A Study on the Importance of Phenylalanine for Aurein Functionality. *Protein Pept Lett.* 2009. doi:10.2174/092986609789839340

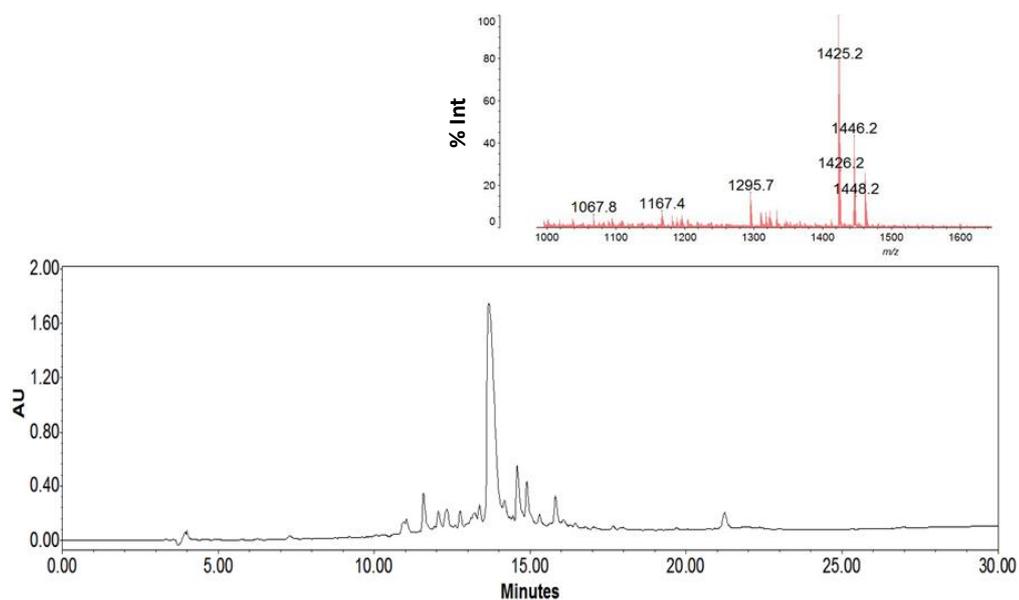
57. Lee E, Shin A, Jeong KW, Jin B, Jnawali HN, Shin S, et al. Role of phenylalanine and valine¹⁰ residues in the antimicrobial activity and cytotoxicity of piscidin-1. *PLoS One*. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0114453
58. Du Q, Hou X, Ge L, Li R, Zhou M, Wang H, et al. Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, *Androctonus crassicauda*, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines. *Int J Biol Sci*. 2014. doi:10.7150/ijbs.9859
59. Gao Y, Wu D, Wang L, Lin C, Ma C, Xi X, et al. Targeted modification of a novel amphibian antimicrobial peptide from *Phyllomedusa tarsius* to enhance its activity against MRSA and microbial biofilm. *Front Microbiol*. 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.00628
60. Gong Z, Pei X, Ren S, Chen X, Wang L, Ma C, et al. Identification and rational design of a novel antibacterial peptide dermaseptin-ac from the skin secretion of the red-eyed tree frog *Agalychnis callidryas*. *Antibiotics*. 2020. doi:10.3390/antibiotics9050243
61. Conlon JM, Abraham B, Galadari S, Knoop FC, Sonnevend A, Pál T. Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. *Peptides*. 2005. doi:10.1016/j.peptides.2005.04.003
62. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front Pharmacol*. 2018;9: 281. Available: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00281>
63. Almeida JR, Mendes B, Lancellotti M, Marangoni S, Vale N, Passos Ó, et al. A novel synthetic peptide inspired on Lys⁴⁹ phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus* abyssus snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. *Eur J Med Chem*. 2018. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.055
64. Bondaryk M, Staniszevska M, Zielińska P, Urbańczyk-Lipkowska Z. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. *Journal of Fungi*. 2017. doi:10.3390/jof3030046
65. Lum KY, Tay ST, Le CF, Lee VS, Sabri NH, Velayuthan RD, et al. Activity of novel

- synthetic peptides against *Candida albicans*. *Sci Rep*. 2015. doi:10.1038/srep09657
66. Carolus H, Van Dyck K, Van Dijck P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. *Frontiers in Microbiology*. 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.02162
67. de Alteriis E, Maselli V, Falanga A, Galdiero S, Di Lella FM, Gesuele R, et al. Efficiency of gold nanoparticles coated with the antimicrobial peptide indolicidin against biofilm formation and development of *Candida* spp. clinical isolates. *Infect Drug Resist*. 2018. doi:10.2147/IDR.S164262
68. Fernández de Ullivarri M, Arbulu S, Garcia-Gutierrez E, Cotter PD. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. doi:10.3389/fcimb.2020.00105
69. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
70. Jiang Z, Vasil AI, Vasil ML, Hodges RS. "Specificity determinants" improve therapeutic indices of two antimicrobial peptides piscidin 1 and dermaseptin S4 against the gram-negative pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals*. 2014. doi:10.3390/ph7040366
71. Madanchi H, Khalaj V, Jang S, Shabani AA, Ebrahimi Kiasari R, Seyed Mousavi SJ, et al. AurH1: a new heptapeptide derived from Aurein1.2 antimicrobial peptide with specific and exclusive fungicidal activity. *J Pept Sci*. 2019. doi:10.1002/psc.3175
72. Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016. doi:10.1038/srep29707
73. Cardoso P, Glossop H, Meikle TG, Aburto-Medina A, Conn CE, Sarojini V, et al. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophysical Reviews*. 2021. doi:10.1007/s12551-021-00784-y

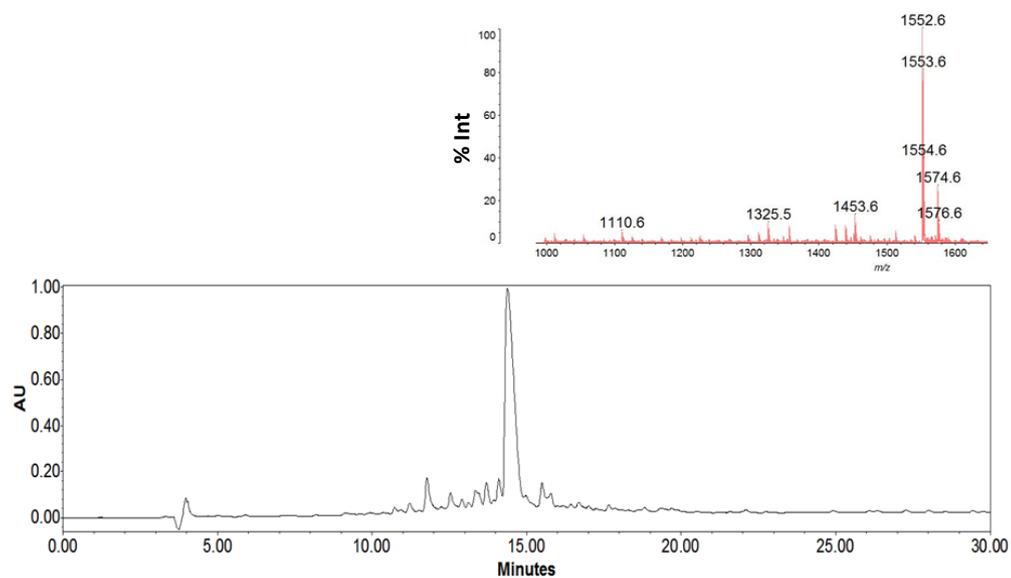
74. Tripathi AK, Kumari T, Tandon A, Sayeed M, Afshan T, Kathuria M, et al. Selective phenylalanine to proline substitution for improved antimicrobial and anticancer activities of peptides designed on phenylalanine heptad repeat. *Acta Biomater.* 2017. doi:10.1016/j.actbio.2017.05.007
75. Liu Y, Du Q, Ma C, Xi X, Wang L, Zhou M, et al. Structure–activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin-PHa: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities. *Drug Des Devel Ther.* 2019. doi:10.2147/DDDT.S191072
76. Cardoso MH, Ribeiro SM, Nolasco DO, De La Fuente-Núñez C, Felício MR, Gonçalves S, et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. *Sci Rep.* 2016. doi:10.1038/srep21385
77. Sani MA, Henriques ST, Weber D, Separovic F. Bacteria may cope differently from similar membrane damage caused by the Australian tree frog antimicrobial peptide maculatin 1.1. *J Biol Chem.* 2015. doi:10.1074/jbc.M115.643262
78. Xie J, Gou Y, Zhao Q, Wang K, Yang X, Yan J, et al. Antimicrobial activities and membrane-active mechanism of CPF-C1 against multidrug-resistant bacteria, a novel antimicrobial peptide derived from skin secretions of the tetraploid frog *Xenopus clivii*. *J Pept Sci.* 2014. doi:10.1002/psc.2679
79. Yuan Y, Zai Y, Xi X, Ma C, Wang L, Zhou M, et al. A novel membrane-disruptive antimicrobial peptide from frog skin secretion against cystic fibrosis isolates and evaluation of anti-MRSA effect using *Galleria mellonella* model. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2019. doi:10.1016/j.bbagen.2019.02.013
80. León-Buitimea A, Garza-Cárdenas CR, Garza-Cervantes JA, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Frontiers in Microbiology.* 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.01669
81. Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids.* 2006. doi:10.1007/s00726-005-0289-3
82. Abdi M, Mirkalantari S, Amirmozafari N. Bacterial resistance to antimicrobial

peptides. Journal of Peptide Science. 2019. doi:10.1002/psc.3210

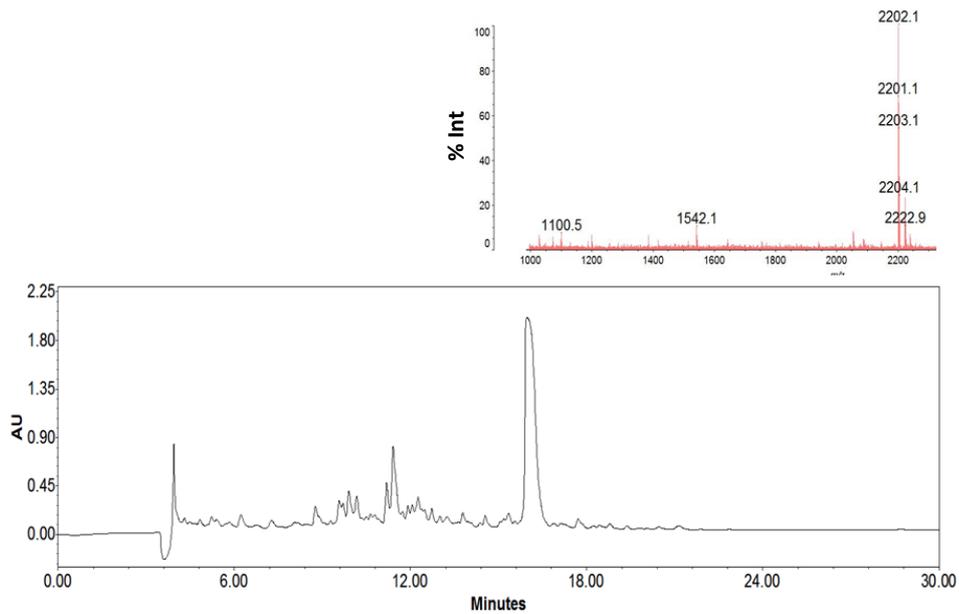
Anexos



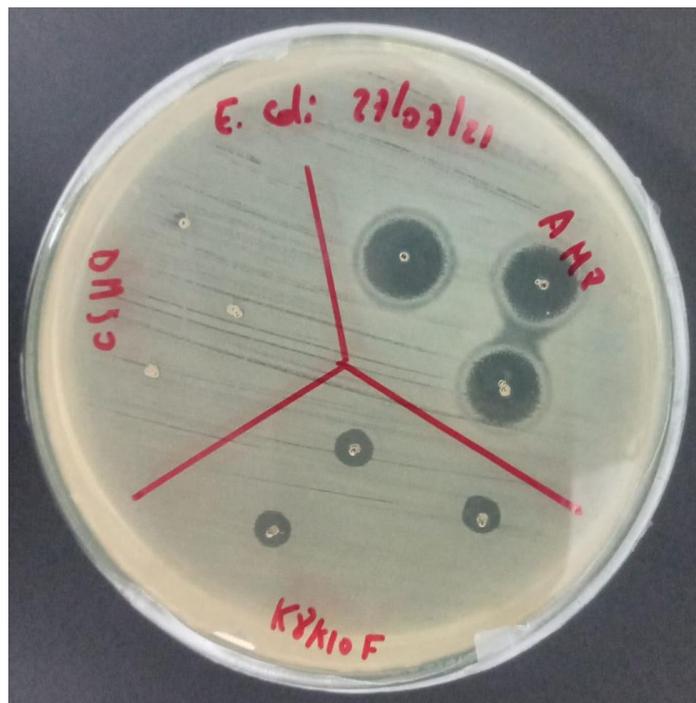
Anexo 1. Cromatogramas y espectro de masas de CZS-1[6-20] obtenido después de la síntesis química. CZS-1[6-20] tuvo un tiempo de retención de 13.76 minutos.



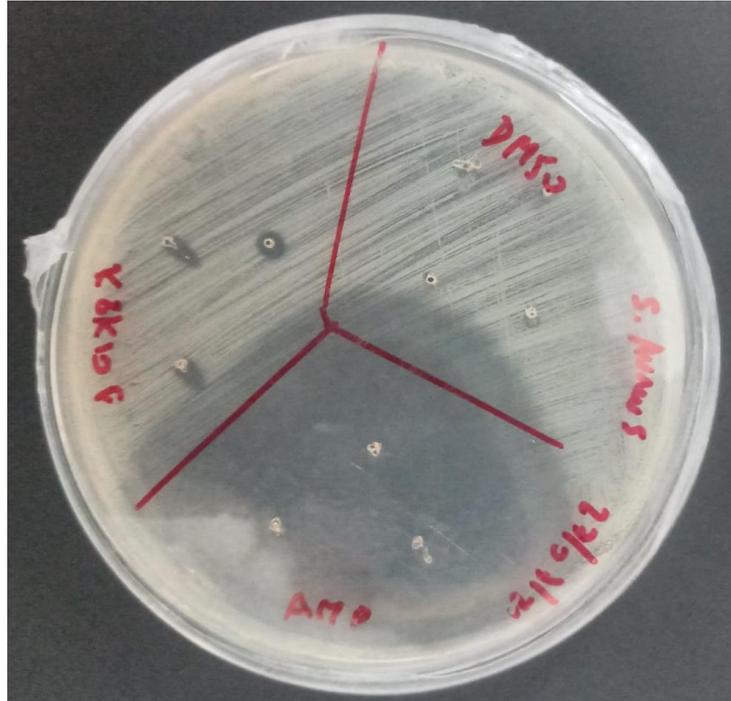
Anexo 2. Cromatogramas y espectro de masas de [K8K10] obtenido después de la síntesis química. [K8K10] tuvo un tiempo de retención de 14.78 minutos



Anexo 3. Cromatogramas y espectro de masas de [K4K15] obtenido después de la síntesis química. [K4K15] tuvo un tiempo de retención de 15.96 minutos



Anexo 4. Análisis exploratorio de la actividad antibacteriana de K8K10F (secuencia: VKGVGKVKLKAVSKLF) en contra de *E. coli*. AMP: ampicilina (1 mg/mL), DMSO es el solvente que se usó para diluir el péptido, K8K10F en una concentración de 1024mg/L.



Anexo 5. Análisis exploratorio de la actividad antibacteriana de K8K10F (secuencia: VKGVGKVKLKAVSKLF) en contra de *S. aureus*. AMP: ampicilina (1 mg/mL), DMSO es el solvente que se usó para diluir el péptido, K8K10F en una concentración de 1024mg/L.