



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de ciencias de la vida

Ingeniería en Biotecnología

Evaluación de bioactividad de péptidos derivados de la piel
de anfibios: enfoque in silico e in vitro

Jean Pierre Ramos Galarza

24 de noviembre del 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 25 de agosto de 2021

Yo, Jean Pierre Ramos Galarza con documento de identidad N° 0705440089, 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:



Jean Pierre Ramos Galarza

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Evaluación de bioactividad de péptidos derivados de la piel de anfibios: enfoque in sílico e in vitro”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Jean Pierre Ramos Galarza 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 Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 25 de Agosto de 2021

Firma:

.....

Carolina del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 1714818760

Agradecimientos

Dra. Carolina Proaño por la supervisión de la tesis y consejos académicos y personales recibidos.

Grupo de Descubrimiento de Biomoléculas de Universidad Ikiam; especialmente a Giovanna y Nina por la asesoría en los ensayos de laboratorio.

Dra. Lorena Meneses, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE, por la revisión de los scripts de dinámica molecular

Dra. Mabel Torres, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por los ensayos en líneas celulares cancerosas.

Dedicatoria

A mis padres; Willian y Ofelia por su infinito amor y apoyo recibido siempre.

A mi hermano menor Valentino por su cariño y enseñarme siempre algo nuevo.

A mi abuelito Santos por demostrarme que no es necesario ver para sentir cuando algo realmente te apasiona.

A mi familia por sus consejos y ser mi soporte.

A todos mis amigos por acompañarme y permitirme haber compartido grandes momentos

Índice General

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Resumen:	xi
Abstract:	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Péptidos antimicrobianos	1
1.3 Péptidos aislados de anfibios.....	2
1.4 Actividad terapéutica.....	6
1.5 Peptidología computacional	7
1.6 Planteamiento del problema	16
1.7 Justificación de la investigación.....	16
1.8 Objetivos de la investigación	17
CAPITULO II: MARCO METODOLOGICO	18
2.1 Fuente de péptidos	18
2.2 Estrategia bioinformática.....	18
2.3 Caracterización funcional	22
CAPITULO III: PRESENTACION DE DATOS Y RESULTADOS	24
3.1 Propiedades fisicoquímicas	24
3.2 Docking molecular	25
3.3 Dinámica Molecular	31

3.4	Energía libre de enlace.....	37
3.5	Concentración mínima inhibitoria	39
3.6	Ensayos anticancerígenos.....	40
3.7	Ensayos hemolíticos.....	42
CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....		45
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		47

Índice de figuras

Figura 1. Flujo de proceso metodológico de las simulaciones de dinámica molecular. Los análisis in silico fueron realizados en el software Amber20 y graficados en el software R Studio.....	21
Figura 2. Sitio activo de la proteinasa aspártica secretada de <i>C. albicans</i> acoplada con a. inhibidor conocido A70 y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).	26
Figura 3. Sitio activo de Exo-B- (1,3) – glucanasa de <i>C. albicans</i> acoplada a. inhibidor conocido castanospermina y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).	27
Figura 4. Sitio activo de la proteína de unión a penicilina 2A acoplada con a. inhibidor conocido penicilina y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).....	27
Figura 5. Sitio activo de la proteína de unión a penicilina transglicosilasa 1B acoplada con a. inhibidor conocido penicilina y b. CZS-3. Sitio de unión del receptor acoplado con c) los péptidos AS1 (amarillo), CC3 (morado) y CC4 (celeste).	28
Figura 6. Sitio activo de ADN girasa B acoplada a. inhibidor conocido ADP y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).....	28
Figura 7. Sitio activo de quinasa del linfoma anaplásico humano acoplado con a. inhibidor conocido EMH y b. péptidos CC3 (morado) y CC4 (celeste). Sitio de unión del receptor acoplado con c) AS1 (amarillo) y RK-1 (verde).	29

Figura 8. Sitio activo de quinasa VEGFR2 humana acoplado con a. inhibidor conocido pirrolopirimidina b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).....	29
Figura 9. Sitio activo de GTPasa K-Ras acoplada a. Inhibidor conocido GDP y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).	30
Figura 10. Sitio activo de la polimerasa 1 de poli [ADP-Ribosa] acoplada con a. Inhibidor conocido isoindolinona y b. Los péptidos CC3 (morado) y CC4 (celeste). Sitio de unión del receptor acoplado con c. AS1 (amarillo) y RK1 (verde).....	30
Figura 11. Sitio activo de proteína quinasa activada por mitógenos acoplada a. Inhibidor conocido ibrutinib, b. Los cuatro péptidos analizados; AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).....	31
Figura 12. Parámetro densidad de los complejos de los péptidos sintéticos: a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores bacterianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.....	32
Figura 13. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido AS1 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.	33
Figura 14. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido CC3 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.	33
Figura 15. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.....	34
Figura 16. Parámetro de temperatura (K) de los péptidos sintéticos a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.....	35

Figura 17. RMSD backbone (Å) de los péptidos sintéticos a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que los valores tendían a converger y alcanzar el equilibrio..... 36

Figura 18. Concentración mínima inhibitoria del péptido sintético AS1 contra a. *C. albicans*, b. *E. coli* y c. *S. aureus*. Los microorganismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de péptidos desde 1 a 512 mg/L. Los experimentos fueron realizados por triplicado..... 39

Figura 19. Concentración mínima inhibitoria del péptido sintético CC4 contra a. *C. albicans*, b. *E. coli* y c. *S. aureus*. Los microorganismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de péptidos desde 2 a 1024 mg/L. Los experimentos fueron realizados por triplicado..... 40

Figura 20. Viabilidad celular de A549 mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado..... 41

Figura 21. Viabilidad celular de HFF mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado..... 41

Figura 22. Viabilidad celular de HFF mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado..... 42

Figura 23. Porcentaje de hemolisis del péptido AS1. El péptido presento hemolisis desde 512 mg/L. El control positivo (Triton X-100) fue considerado como el 100% de hemolisis. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc Tukey (* $p \leq 0.05$)..... 43

Figura 24. Porcentaje de hemolisis del péptido CC4. El péptido no superó el 3% de disrupción celular en las distintas concentraciones. El control positivo (Triton X-100) fue considerado como el 100% de hemolisis. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc Tukey (* $p \leq 0.05$)..... 43

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencia y tamaño de los péptidos analizados y los de control. Los péptidos analizados fueron aislados de las especies <i>Cruziohyala calcerifer</i> (CC) y <i>Agalychnis spurelli</i> (AS) y presentan terminación amida (a).....	18
Tabla 2. Enzimas claves en la actividad antimicrobiana. La estructura tridimensional fue obtenida en la base de datos Protein Data Bank (PDB) y presentan una resolución menor a 2.5 Å.....	19
Tabla 3. Dianas moleculares en la actividad cancerígena. La estructura tridimensional fue obtenida en la base de datos Protein Data Bank (PDB) y presentan una resolución menor a 2.5 Å.....	19
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los tres péptidos aislados de <i>A. spurelli</i> y <i>C. calcerifer</i>. Los péptidos presentaron carácter catiónico con un punto isoeléctrico básico24	
Tabla 5. Predicción de estructura secundaria de los tres péptidos utilizando el servidor Porter 5.0 utilizando el algoritmo DSSP.	25
Tabla 6. Valores de afinidad de enlace de receptores microbianos contra los péptidos estudiados utilizando MMGBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.....	37
Tabla 7. Valores de afinidad de enlace de receptores microbianos contra los péptidos estudiados utilizando MMPBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.....	38
Tabla 8. Valores de afinidad de enlace de receptores cancerígenos contra los péptidos estudiados utilizando MMGBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.....	38
Tabla 9. Valores de afinidad de enlace de receptores cancerígenos contra los péptidos estudiados utilizando MMPBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.....	38

Resumen:

En esta investigación, presentamos un estudio computacional de tres péptidos aislados de las secreciones cutáneas de la piel de los anfibios de *Cruziohyla calcarifer* y *Agalychnis spurelli*. Experimentalmente, la secuencia aminoacídica se dilucidó en un estudio previo mediante clonación molecular y espectrometría de masas en tándem. Los péptidos fueron acoplados con receptores microbianos y cancerígenos claves mediante docking molecular. Adicionalmente se realizó dinámica molecular para cuantificar la interacción receptor-péptido utilizando MMGBSA y MMPBSA. Posteriormente, los péptidos fueron sintetizados en fase sólida y analizados contra los microorganismos *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus* y contra tres líneas celulares; A549, HFF y HEK 293T para determinar las propiedades antimicrobianas y anticancerígenas respectivamente. Además, se evaluó la toxicidad de los péptidos mediante ensayo de hemólisis. Los resultados bioinformáticos indicaron que AS1 fue el más prometedor debido a que presentó valores de enlace más bajos en las interacciones. Los ensayos MIC indicaron que AS1 es el único que presentó actividad antimicrobiana contra los tres microorganismos evaluados a una concentración de 256 y 512 mg/L. Aunque en los ensayos anticancerígenos todos los péptidos mostraron actividad significativa $p < 0.001$ a 500 μM contra las tres líneas celulares, AS1 presentó los valores más bajos. Finalmente, en la evaluación de toxicidad el péptido AS1 fue el único que mostró toxicidad a 256 y 512 mg/L, indicando que es necesario buscar alternativas para disminuir la actividad hemolítica. Este estudio preliminar sugiere que AS1 fue identificado como un péptido candidato mediante las herramientas bioinformáticas, permitiendo la disminución de tiempo y costos.

Palabras clave: péptidos, anfibios, bioinformática, antimicrobiano, anticancerígeno.

Abstract:

In this research, we present a computational study of three peptides isolated from the skin secretions of the amphibians *Cruziophyla calcarifer* and *Agalychnis spurelli*. Experimentally, the amino acid sequence was elucidated in a previous study by molecular cloning and tandem mass spectrometry. Peptides were coupled with key microbial and carcinogenic receptors by molecular docking. Additionally, molecular dynamics were performed to quantify the receptor-peptide interaction using MMGBSA and MMPBSA. Subsequently, the peptides were synthesized in solid phase and analyzed against the microorganisms *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus* and against three cell lines; A549, HFF and HEK 293T to determine the antimicrobial and anticancer properties. In addition, peptide toxicity was assessed by haemolytic test. Bioinformatic results indicated that AS1 was the most promising because it presented lower bond values in interactions. The MIC trials indicated that AS1 was the only one with antimicrobial activity against the three microorganisms evaluated at a concentration of 256 and 512 mg/L. Although anticancer assays all peptides showed significant $p < 0.001$ to 500 μM activity against the three cell lines, AS1 presented the lowest values. Finally, in the toxicity evaluation the AS1 peptide was the only one that showed toxicity at 256 and 512 mg/L, indicating that it is necessary to look for alternatives to decrease the hemolytic activity. This preliminary study suggests that AS1 was identified as a candidate peptide using bioinformatics tools, allowing a reduction in time and costs.

Keywords: peptides, amphibians, bioinformatics, antimicrobial, anticancer.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

Los péptidos son secuencias aminoacídicas cortas que se encuentran en todos los organismos y cumplen un papel fundamental en una amplia gama de procesos biológicos. En la última década se han identificado más de 7000 péptidos y se ha encontrado que poseen una variedad de actividades, tales como anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, penetrantes celulares, etc. Debido a estas propiedades terapéuticas los péptidos muestran un gran potencial en el diseño de terapias novedosas o en la entrega de terapias [1].

La utilización de péptidos como agentes terapéuticos ha evolucionado con el tiempo y sigue en constante evolución con los cambios en el desarrollo de fármacos y los paradigmas de tratamiento [2]. De hecho, el primer aislamiento y uso terapéutico de un péptido fue la insulina en la década de 1920 en pacientes diabéticos que no producían cantidades suficientes de la hormona. Posteriormente, la práctica de aislar péptidos del tejido animal continuó con la purificación de la hormona adrenocorticotropa de las glándulas pituitarias del ganado con la finalidad de tratar una variedad de trastornos endocrinos en pacientes [3,4]. Luego, en los años de 1950 cuando la elucidación de secuencias y síntesis químicas de péptidos se hicieron factibles, la oxitocina sintética y la vasopresina también entraron en uso clínico. A medida que se realizaron estudios sobre venenos de artrópodos y cefalópodos que posteriormente presentaron bioactividad, el aislamiento de productos naturales de fuentes exóticas se convirtió en una estrategia popular para identificar nuevas terapias potenciales. La llegada de la era genómica permitió la identificación y caracterización molecular de receptores para muchas hormonas peptídicas endógenas importantes, incitando a la industria y a la academia a buscar nuevos ligandos peptídicos para estos receptores [2].

1.2 Péptidos antimicrobianos

Un subgrupo de péptidos que presenta un prometedor potencial terapéutico son los denominados péptidos antimicrobiano (AMPs). Los AMPs poseen secuencias cortas entre 10 y 60 aminoácidos, generalmente están cargados positivamente y han sido encontrados

en una amplia variedad de especies desde microorganismos hasta humanos [5]. El descubrimiento de AMPs se remonta a 1939, cuando Dubos [6,7] extrajo un agente antimicrobiano de una cepa de *Bacillus* del suelo. Posteriormente, identificaron el péptido que fue denominado como gramicidina, que resultó eficaz para el tratamiento tópico de heridas y úlceras. Posteriormente, en la década de 1980 mediante ensayos se pudo determinar que cuando se inyecta bacterias dentro de la polilla de seda de *Cecropia*, se induce a la producción de un potente AMP. Estos péptidos denominados “cecropinas” fueron el primer reporte importante de los AMPs con estructura α -hélice. Estos hallazgos llamaron la atención de investigadores y en los siguientes años hubieron avances notables como el descubrimiento de las “magaininas” de la rana *Xenopus laevis*. Además se reportó la primera evidencia que los AMPs juegan un papel crítico en la defensa del huésped tanto en mamíferos como insectos. Desde entonces, los AMPs han sido descubiertos, aislados y caracterizados ampliamente en prácticamente todos los organismos multicelulares. Las fuentes de AMPs son diversas y se dividen principalmente en mamíferos, anfibios, microorganismos e insectos acorde a los datos estadísticos de Antimicrobial Peptide Database 3 (APD3)[8]. Actualmente, un total de 3257 AMPs han sido reportados en APD3 (<https://wangapd3.com/main.php>) actualizada 10 junio del 2021.

1.3 Péptidos aislados de anfibios

En animales, los AMP se encuentran principalmente en los tejidos y órganos que están expuestos a patógenos transportados por el aire; y se cree que son la primera línea de la defensa inmune innata contra virus, bacterias y hongos[9,10]. En los anfibios se han podido aislar péptidos antimicrobianos a partir de las secreciones cutáneas y es la fuente de cientos de AMPs diferentes[11]. Los péptidos son almacenados en las glándulas granulares, localizados principalmente en la región dorsal de la piel, que están rodeadas de miocitos e inervadas por fibras simpáticas. Los AMPs en anfibios son producidos por la estimulación adrenérgica de los miocitos en respuesta a estrés, provocando la compresión de las glándulas serosas que contienen péptidos, desencadenando en la descarga de su contenido. Mediante ensayos, se ha demostrado que los péptidos aislados de anfibios muestran potentes actividades citolíticas *in vitro* contra una variedad de microorganismos patógenos.

Siendo los péptidos un componente importante en el sistema inmune innato, actuando como neutralizador de endotoxinas, quimiotaxis y cicatrización de heridas [12] . Hasta el momento se han caracterizado AMPs en anfibios pertenecientes a catorce familias del orden Archaeobatrachia y Neobatrachia [13]. A través de análisis bioinformáticas con más de 1000 AMPs registrados en los últimos 18 años en APD se pudo concluir que el 99.9% de AMPs de anfibios presentan una longitud menor a 50 aminoácidos con un tamaño promedio de 24 residuos y una carga neta de +2.5 [14] . Además, presentan ciertas características, tales como sus estructuras y pueden dividirse en cuatro categorías basadas en su estructura. Entre ellas se incluyen: péptidos α -hélice, péptidos lámina β , estructura de extensión lineal y péptidos de α -hélice y lamina β [15].

1.3.1 Mecanismo de acción

En general, los péptidos antimicrobianos matan a las bacterias al romper su membrana o al ingresar al interior de las células bacterianas para interactuar con los componentes intracelulares. A pesar de que muchos estudios han informado estos mecanismos de acción de los AMPs catiónicos, actualmente no existe una teoría que pueda aplicarse para explicar el mecanismo de todos los AMPs catiónicos. Hasta el momento, la mayoría de estudios actuales se basan en membranas lipídicas artificiales[16]. La composición y estructura de las membranas artificiales son diferentes a las membranas celulares bacterianas. Por lo tanto, los resultados de estos experimentos no pueden explicar verdaderamente la acción de los AMPs en los microbios. En la actualidad los mecanismos se pueden clasificar en dos grupos; los que interactúan con la membrana y los que no interactúan con la membrana[17].

1.3.1.1 Interacción con la membrana

La mayoría de AMPs despliegan una rápida y directa actividad antimicrobiana mediante la disrupción de la integridad física de la membrana microbiana. La pared celular de las dos tipos; Gram positiva y Gram negativa son ricas en fosfolípidos fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina que tienen grupos cargados negativamente siendo factores críticos para que ocurra la interacción entre los péptidos y la membrana[18,19]. El mecanismo del daño de la membrana celular generalmente ocurre en dos pasos. Primero, la fuerza electrostática entre los AMPs catiónicos y la superficie bacteriana cargada negativamente permite que ocurra una unión selectiva y luego destruyan las membranas bacterianas por el modo putativo de perforación o no perforación. El modo de perforación de la membrana se puede clasificar en cuatro modelos hipotéticos que incluyen los modelos de barrel-stave, alfombra, poro toroidal y canal agregado [20,21].

1.3.1.2 Sin Interacción con la membrana

La evidencia muestra que, además de actuar en la membrana celular, los AMP pueden inhibir el plegamiento de proteínas, actividad enzimática y actuar intracelularmente. La forma en que los AMPs entran a la célula es mediante penetración directa o endocitosis [8]. Luego de la endocitosis sigue una micropinocitosis o vías mediadas por receptores. En la micropinocitosis, la dinámica facilita la formación de macropinosomas portadores de AMPs derivados de la membrana celular. En una vía mediada por receptores, la formación de pequeñas vesículas en el citoplasma está precedida por la formación de fosas mediadas por proteínas de membrana [22,23].

1.3.1.3 Inhibidores de biosíntesis de ácidos nucleicos

Los péptidos antimicrobianos pueden afectar enzimas claves o inducir a la degradación de moléculas de ácidos nucleicos con el fin de inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos[24]. Existen varios ejemplos de péptidos inhibidores de ácidos nucleicos, entre los más conocidos están los buforinas, β -defensinas e indolicidina. La buforina II, un péptido de fragmento de 21 aminoácidos probado contra *Escherichia coli* mostró que la buforina II exhibía una alta afinidad de unión al ácido nucleico. Por lo tanto, interviene fuertemente en la inhibición de los procesos celulares al interrumpir el metabolismo del ADN y ARN[25,26].

1.3.1.4 Inhibidores de biosíntesis de proteínas

La biosíntesis de proteínas conlleva varios pasos y protagonistas claves para que pueda llevarse a cabo correctamente. Los eventos empiezan con la transcripción, seguido de la traducción a través de la maquinaria ribosómica antes de someterse al plegamiento asistido por la chaperona y al ensamblaje en proteínas funcionales. La interferencia con cualquiera de las enzimas asociadas o moléculas efectoras podría resultar en la detención de la biosíntesis de proteínas. Se ha podido comprobar que ciertos AMPs inhiben estos blancos con el fin de eliminar las células bacterianas. Un ejemplo es el péptido Bac7, un AMP de 60 residuos considerablemente grande que ejerce una actividad intracelular al dirigirse a los ribosomas e inhibir la traducción [24,27].

1.3.1.5 Inhibidor de proteasas y división celular

Varios AMPs pueden interferir en diversas actividades metabólicas al inhibir la actividad de las proteasas. Un ejemplo es la histatina 5, miembro de las histatinas que están presentes en las secreciones salivales humanas. En estudios previos se halló que la histatina 5 presenta una fuerte actividad inhibidora contra las proteasas secretadas por el huésped y la bacteria[8,28]. Se ha demostrado que los AMPs tienen una actividad inhibidora en los procesos de las células bacterianas. La inhibición de la replicación del ADN, la inducción de los genes SOS, la segregación cromosómica o la falla del proceso de septación puede provocar la filamentación celular bacteriana [29].

1.4 Actividad terapéutica

El amplio espectro de los AMPs los convierte en candidatos prometedores para diferentes áreas terapéuticas. De hecho, en Therapeutics Proteins Database (subconjunto de base de datos de la FDA) existen un total de 852 proteínas y péptidos terapéuticos. De los cuales, 239 han sido validados mientras que los demás son sus derivados, y 27 de los 239 son péptidos pequeños (menos de 50 aminoácidos). Además, seis de los péptidos pequeños son péptidos antimicrobianos [30,31].

1.4.1 Actividad antimicrobiana

A inicios de siglo XXI, el aumento de aparición de patógenos bacterianos multiresistentes se ha convertido en un problema mundial. La organización mundial de la salud ha mencionado que existe la urgencia en el diseño de nuevas moléculas antimicrobianas, porque los antibióticos convencionales son cada vez inútiles, especialmente contra los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* y especies de *Enterobacter* spp), que mostraron alta tendencia a desarrollar resistencia[32,33].

La resistencia generalizada ha generado interés para el uso de inhibidores microbianos naturales como los péptidos antimicrobianos. Los AMPs, causan muerte celular al interrumpir la membrana celular de los microorganismos; inhibición de la síntesis de polímeros o funciones intracelulares [34]. Debido a que actúan en la membrana y sobre

múltiples objetivos celulares, la resistencia microbiana ante los AMPs se reduce porque es difícil que modifiquen la composición de la pared o alteren cada uno de los objetivos intracelulares[35].

1.4.2 Actividad anticancerígena

El cáncer es un grupo de varias enfermedades complejas que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado y la capacidad de propagarse rápidamente o invadir otras partes del cuerpo. Esta complejidad inherente del cáncer ha demostrado ser un obstáculo importante para el desarrollo de terapias eficaces. Los métodos convencionales para el tratamiento del cáncer, tales como la radioterapia y la quimioterapia son costosos y a menudo exhiben efectos secundarios nocivos para las células normales [36]. Además, las células cancerosas desarrollan a menudo resistencia a fármacos quimioterapéuticos actuales.

Algunos péptidos han mostrado selectividad contra células tumorales en humanos, a los cuales se los denomina péptidos anticancerígenos (ACPs)[37]. Una búsqueda en la base de datos de US National Institute of Health Clinical Trials usando la palabra “anti-cancer peptides” encontraron a 1002 ensayos clínicos basados en péptidos que están siendo probados en diferentes tipos de cáncer[38]. Los mecanismo mostrados por los ACPs indican que estos pueden dirigirse a la membrana y destruir las células tumorales, inducir a la apoptosis, inhibir la angiogénesis y regular el sistema inmune. Debido a sus mecanismos de acción, los ACPs presentan muchas ventajas sobre la terapia convencional [39].

1.5 Peptidología computacional

Los péptidos terapéuticos se originan tradicionalmente a partir de péptidos naturales o, alternativamente, se desarrollan mediante un protocolo de diseño racional. Debido a que el descubrimiento de péptidos activos naturales es a menudo una cuestión de casualidad [40], el enfoque racional ha estimulado un interés creciente en la comunidad médica[41]. No obstante, el diseño racional de un ligando peptídico que pueda unirse de manera estable y específica es un desafío debido a la flexibilidad de los péptidos. Recientemente la metodología computacional se ha extendido ampliamente en el campo del diseño de

péptidos, convirtiéndose en una forma nueva y prometedora para el diseño racional de agentes peptídicos. Debido a que la ciencia de los péptidos es un campo emergente, se sugiere el término de peptidología computacional teniendo registro de este término desde el año 2012 [42,43].

La peptidología computacional es un novedoso subcampo que se centra en el uso de enfoques computacionales, teóricos y bioinformáticos para tratar problemas relacionados con los péptidos[44]. Generalmente, para el diseño de nuevos péptidos terapéuticos se trabaja con objetivos farmacológicos (generalmente proteínas) que presentan pequeñas cavidades activas. Existe una estimación de posibles objetivos farmacológicos en el genoma humano que puede oscilar entre 3000 y 5000, y solo una fracción de ellos se espera que estén directamente relacionados con una enfermedad[45].

Las interacciones esperadas dentro de los análisis de los péptidos junto con los receptores farmacológicos, son conocidas como interacciones proteína-proteína (PPIs)[46,47]. Se conoce desde hace mucho tiempo que los PPIs desempeñan un papel regulatorio en numerosos procesos celulares tales como catalizador de reacciones, transporte de moléculas, reacciones inmunes a diversos patógenos y la transducción de señales entre células [48–50]. Los PPIs en las células forman una red compleja que es conocida como “interactoma”. El interactoma tiene un papel importante en los procesos fisiológicos y patológicos, incluida la transducción de señales, el crecimiento, proliferación y diferenciación celular y la apoptosis. Por lo tanto, algún PPIs que funcione inadecuadamente está asociada a muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas y neurodegenerativas[51–53].

En la última década, los péptidos han surgido como candidatos para tratar diversas enfermedades mediante la modulación de los PPIs. Además, considerando que entre el 15% y 40% de los aproximadamente 10000 tipos de PPIs de origen natural están mediados por interacciones proteína péptido, habría una gran cantidad de complejos de proteínas en la célula bajo el control de los péptidos[47,51]. Sin embargo, el diseño tradicional de péptidos demanda recursos en tiempo y costos. La metodología computacional se ha extendido

ampliamente y se ha convertido en una nueva forma prometedora para el diseño de agentes peptídicos dirigidos a PPIs. Entre las herramientas que son comúnmente utilizadas para el diseño de nuevos péptidos mediante enfoques computacionales, están el docking y dinámica molecular [54,55].

1.5.1 Docking molecular

Docking molecular es una técnica computacional automatizada empleada en diseño de fármacos asistido por computadora para la identificación de agentes bioactivos potentes. El objetivo de la técnica es encontrar el mejor modo de unión de un ligando dado con su diana macromolecular y evalúa la afinidad de unión, cuyos resultados se utilizaron para clasificar y seleccionar los ligandos prometedores. El éxito de búsqueda del algoritmo de docking depende de la implicación de un método eficiente, que se utiliza para buscar el panorama energético potencial de los ligandos para encontrar su configuración óptima, acompañado en ciertas ocasiones de un esquema de puntuación adecuado para evaluar los modos de unión del ligando con sus objetivos [56,57].

Los orígenes del área de acoplamiento molecular de proteínas se remontan a los primeros días del modelamiento molecular. Antes de 1970, los campos de fuerza empleados eran más simples debido a los limitados recursos computacionales. Los primeros enfoques de acoplamiento no fueron para los complejos proteína-proteína o péptido-proteína debido a que conlleva un algoritmo más complejo y más recursos informáticos. Por lo tanto, trabajaron con pequeños ligandos sintéticos interaccionando con proteínas. Los enfoques de acoplamiento proteína-proteína siguieron en breve, implementando la búsqueda global de la pose de acoplamiento en una aproximación de cuerpo rígido[58–61]. La eficiencia de las predicciones de conformación en los complejos péptido-proteína ha sido ampliamente demostrada[62]. Los enfoques comúnmente utilizados incluyen el acoplamiento basado en plantillas como GalaxyPepDock[63], acoplamiento local de péptidos a sitios de unión predefinidos como Rosetta FlexPepDock[64], HADDOCK [65] y MDockPep[66], y el acoplamiento global de péptidos libres que se unen a proteínas como CABS-Dock [67], PIPER-FlexPepDock[68] y PeptiDock [69].

1.5.1.1 Acoplamiento basado en plantillas

El método basado en plantillas usa estructuras conocidas (plantillas) como andamiaje para construir un modelo del complejo. Este método puede ser particularmente eficaz si la plantilla es similar al complejo investigado. El acoplamiento basado en plantillas se lo realiza de forma manual o semiautomática utilizando un conjunto de herramientas para la comparación y el análisis de secuencia-estructura[70,71].

Existen diferentes estrategias que han sido utilizadas para aprovechar la información de la plantilla para poder modelar complejos de proteínas. Los enfoques representativos incluyen los siguientes: (1) superposición global (alineación estructura-estructura global), para la generación de modelos superponiendo estructuras de proteínas componentes 3D no unidas a plantillas[72]; (2) procesamiento dimérico (alineación secuencia-estructura), que procesa las secuencias de la proteína componente en plantillas estructurales y busca la mejor alineación secuencia-estructura basada en una función de puntuación[73,74]; (3) modelado de homología directa al complejo[75] y (4) modelado basado en la alineación de la estructura de interfaz. Todas las estrategias tienen fortalezas y debilidades, y en algunos casos combinan estrategias para lograr un mejor resultado de modelado[76,77].

1.5.1.2 Acoplamiento local

Los métodos de acoplamiento local realizan una búsqueda de una pose de unión de péptidos en la proximidad de un sitio definido por el usuario; por lo tanto, la precisión del acoplamiento depende de la información de entrada en el sitio de enlace. Los métodos disponibles utilizan diferentes formas de definir el sitio de unión; algunos requieren un modelo inicial del complejo preparado por el usuario (con una rango de aproximación de 5Å de desviación de la raíz cuadrada media de la columna vertebral) [68,78,79]; algunos métodos son menos rigurosos y la conformación de entrada del péptido puede estar lejos de su forma nativa[64]; existen métodos que son más automatizados y amigables con el usuario y colocan la conformación del péptido en la proximidad del sitio de unión definida por una lista de aminoácidos proporcionado por el usuario [65]; otro grupo comprende a herramientas dedicadas en el acoplamiento de moléculas pequeñas y se limita a péptidos cortos [80–82].

1.5.1.3 Acoplamiento global

Los métodos de acoplamiento global realizan una búsqueda del sitio de unión del péptido y la pose. El enfoque más simple para el acoplamiento global proteína péptido es tratar a las conformaciones de entrada de proteína y péptidos rígido y realizar un acoplamiento exhaustivo de cuerpo rígido. Los métodos más sofisticados predicen automáticamente la conformación del péptido utilizando únicamente la secuencia como input dada por el usuario. Esta metodología trabaja mediante un pipeline que suele tener tres etapas: (i) generación de conformación de péptidos de entrada; (ii) acoplamiento de cuerpo rígido; y (iii) puntuación de los modelos y/o refinamiento[62]. En el caso de la conformación estructural del péptido se puede predecir usando varias estrategias, tales como utilización de fragmentos de estructuras de proteínas monoméricas[69,83], realizando un procesamiento de secuencias en un conjunto de predefinido de conformaciones de plantillas[84] o simulando el plegamiento de péptidos en solución[85]. Existen varios software que combinan metodologías, entre ellos tenemos a CABSdock, que combina la generación de conformación de péptidos y el acoplamiento global en una simulación explícita [67].

El software CABSdock empieza a partir de las conformaciones de 10000 estructuras aleatorias e induce sus cambios conformacionales mediante las interacciones que existan con un receptor flexible [86]. Posteriormente, realiza un filtrado de las 10000 poses generadas y elimina aquellas estructuras que tengan interacción nula con el receptor y las que tengan los puntajes de enlace de afinidad más para obtener 1000 estructuras. Los 1000 modelos filtrados se agrupan posteriormente en grupos utilizando el procedimiento de agrupación k-medoides. El agrupamiento es ejecutado 100 veces con diferentes semillas iniciales y $k=10$. Los medoides de consenso son seleccionados y se obtienen los 10 modelos finales. La densidad de los conglomerados se utiliza para clasificar finalmente los modelos. Finalmente los modelos finales son reconstruidos mediante el programa MODELLER[87] debido a que todas las simulaciones de acoplamiento fueron mediante modelación de grano-grueso para disminuir los recursos computacionales y tiempo[88].

1.5.2 Dinámica molecular

La dinámica molecular es una herramienta computacional que predice como cada átomo en una proteína u otro sistema molecular se moverá a lo largo de un tiempo determinado basándose en un modelo general de la física que rige las interacciones interatómica[89,90]. Estas simulaciones pueden capturar una amplia variedad de procesos biomoleculares importantes, en los que se incluyen los cambios conformacionales, la unión de ligandos y el plegamiento de proteínas, revelando posiciones de todos los átomos en una resolución temporal de femtosegundos [89]. Las simulaciones de dinámica molecular no es una técnica reciente. Las primeras simulaciones de gases simples se realizaron a fines de la década de 1950[91]. En el caso de las proteínas la primera simulación fue realizada a fines de la década de 1970[92]. Actualmente la simulación de sistemas que tienen entre 50000 a 100000 átomos es común, y las simulaciones de 500000 átomos son comunes cuando se dispone de las instalaciones informáticas adecuadas. Esta notable mejora se debe al uso de computación de alto rendimiento (HPC) y el desarrollo de algoritmos más sencillos. El sistema modelado podría representarse con diferente grado de detalle. Por lo general, la representación atomística es la que conduce a la mejor reproducción de los sistemas actuales. Sin embargo, existen otras simulaciones que es la de grano grueso que están volviendo muy populares cuando se requiere grandes sistemas o simulaciones largas, debido a que disminuye los recursos computaciones y la duración de la simulación[93].

Un elemento importante dentro de las simulaciones es la representación de los solventes dado que los procesos biológicos ocurren en solución acuosa[94]. El enfoque más efectivo es el más sencillo que es incluir solvente explícito, es decir, introducir modelos atomísticos de moléculas de agua para solvatar el complejo. Se han desarrollado varios modelos de agua a lo largo de los años, siendo los más populares TIP3P[95], TI4P[95] y SPC[96]. La presencia de moléculas de agua explícita proporciona una representación más detallada de las interacciones estudiadas. Una vez construido el sistema, las fuerzas que actúan sobre cada átomo se obtienen derivando ecuaciones de movimiento de Newton , los campos de fuerza, donde la energía potencial se deduce de la estructura molecular[97–99]. Las características moleculares que son representadas mediante el campo de fuerza:

resortes para longitud y ángulos de enlace, las funciones periódicas para las rotaciones del enlace y los potenciales de Lennard-Jones, y la ley de Coulomb para las interacciones de Van der Waals y electrostática, aseguran que los cálculos de energía y fuerza sean rápidos incluso para sistemas grandes. Existen varios campos de fuerza descritos actualmente y difieren entre ellos únicamente por la forma en que están parametrizados[100,101].

En los últimos años las simulaciones se han vuelto populares y visibles, especialmente desde la perspectiva de la biología molecular experimental. De hecho, la utilización de dinámica molecular cada vez es más frecuente en artículos de biología estructural, donde se utiliza para interpretar resultados y guiar el trabajo experimental. Además se ha descrito varias investigaciones de la dinámica molecular aplicado en la línea de descubrimientos de fármacos, permitiendo a los investigadores identificar interacciones cruciales y necesarias para la unión favorable de moléculas pequeñas, péptidos y proteínas con sitios de unión y/o interfaces proteína-proteína[102,103]. El uso sinérgico de las simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre ayudará aún más a aprovechar parámetros termodinámicos y cinéticos esenciales para la predicción de la unión de energía libre. Las capacidades de esta técnica para determinar la interacción de unión y afinidades de unión son valiosas para el diseño de fármacos, debido a que estas predicciones podrían utilizarse para acelerar el desarrollo de fármacos y determinar moléculas candidatas que podrían presentar potencial terapéutico[104].

1.5.3 Estimación de la energía libre de enlace de péptidos

La predicción de la afinidad de unión proteína-péptido ha sido un objetivo principal en el campo del descubrimiento de fármacos, debido a que las magnitudes de la afinidad y la selectividad de los ligandos/fármacos diseñados son cruciales en la selección de posibles moléculas prometedoras [104,105]. Sin embargo, el proceso conlleva una tarea desafiante de lograr con las metodologías computacionales estándar. Los algoritmos de acoplamiento pueden proporcionar información cualitativa rápida sobre los modos de unión de péptidos, pero generalmente fallan en estimar con precisión las afinidades del receptor debido a las aproximaciones intrínsecas del método. Por otro lado, las simulaciones estándar requeriría decenas de microsegundos para recopilar suficientes valores para describir el proceso completo de unión al ligando, lo cual demandaría alto recursos computacionales[106,107]. La limitación de la escala de tiempo de las simulaciones de dinámica molecular se puede superar mediante métodos de energía libre, que están agrupadas en tres principales categorías: perturbación química, vías físicas y métodos de punto final.

Dentro de las categorías mencionadas la que ofrecen un buen balance entre la precisión y la demanda de recursos computacionales son los métodos de punto final. Los más utilizados y que generan más información son la mecánica molecular de área superficial Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) y la mecánica molecular de área superficial de Born generalizada (MM-GBSA). Ambos métodos necesitan una cantidad relativamente corta de muestreo, se pueden utilizar instantáneas de la trayectoria para obtener la energía libre de enlace que se estima obteniendo la diferencia entre la energía libre del complejo y la de cada cuerpo[108]. Las energías libres se calculan como $G = E_{MM} + G_{solv} - TS$, donde E_{MM} es la energía enlazada electrostática y de la van der Waals de la mecánica molecular, G_{solv} es la energía libre de solvatación y TS es la temperatura y entropía respectivamente. La energía libre de solvatación consiste en polar y no polar, donde la energía libre de solvatación polar se puede estimar utilizando Poisson-Boltzmann o Born generalizado y la energía libre de solvatación no polar se predice a partir de una relación lineal con el área de superficie accesible al solvente. Los métodos MM-PBSA y MM-GBSA se han utilizado ampliamente para estimar las energías libre de unión y mostraron resultados definitivamente mejores en

comparación con intentos empíricos como acoplamiento y el cribado virtual[104]. De hecho, varios programas de dinámica molecular, como Amber [109] y Gromacs [110] incluyen módulos dentro de su paquete de instalación, así como tutoriales, permitiendo al usuario tener una guía para realizar las simulaciones y obtener la energía de enlace de interés[111,112].

1.6 Planteamiento del problema

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso laborioso y costoso. Generalmente, se deben analizar decenas o cientos de miles de compuestos para determinar su actividad en algún ensayo bioquímico de alto rendimiento. Los resultados identificados representan únicamente una pequeña fracción del conjunto inicial y es necesario más evaluaciones para cuantificar con precisión la afinidad, estructura, así como el testeo de otras propiedades deseables. Posteriormente, es necesario cuantificar la toxicidad, off-targets y determinar las propiedades farmacocinéticas, realizando un pipeline y obteniendo únicamente un grupo de moléculas con un pequeño número de pistas para llevar a cabo pruebas clínicas finales. Incluso, realizando este laborioso proceso, un bajo porcentaje de moléculas candidatos tienen éxito cuando se los prueba en humanos [113,114].

En los últimos años el desarrollo de fármacos asistido por computadora ha tenido un importante avance debido a la disponibilidad de softwares y algoritmos más precisos y eficientes, aumento en la potencia de procesamiento de las computadoras e incremento en la base de datos de fármacos que permite predecir la posible actividad terapéutica. Dentro de los tipos de fármacos donde han existido más avances, es en el área de peptidología computacional [42]. Permitiendo de esta manera determinar la actividad terapéutica con mejor fiabilidad en péptidos, reduciendo tiempo y costos de experimentación.

1.7 Justificación de la investigación

Los péptidos presentan una serie de ventajas, tales como baja toxicidad y alta especificidad. Sin embargo, a pesar del gran potencial de los péptidos terapéuticos, estos presentan algunas limitaciones, una de las más importantes es conocer la posible actividad terapéutica de los péptidos aislados. Por lo general, la actividad es determinada

tradicionalmente mediante dos enfoques; una comparación de la secuencia peptídica con bibliografía y la base de datos y la segunda es realizar pruebas *in vitro* [115]. Sin embargo, en este estudio el primer enfoque no es válido debido a que los péptidos de estudio no pertenecen a ninguna familia anteriormente descrita. El segundo enfoque requiere demasiado tiempo y dinero. Por lo tanto, una de las alternativas para poder determinar la posible actividad biológica de los péptidos es mediante el uso de herramientas computacionales, tales como docking y dinámica molecular.

La herramienta computacional ampliamente utilizada para el estudio de péptidos candidatos es el docking molecular. De hecho, existen programas de acoplamiento específicos para observar la relación de proteína-péptido, tales como CABSdock, Rosetta FlexPepDock, HADDOCK, DynaDock, PepCrawler, entre otras [64,65,67,78,79]. Esta herramienta puede proporcionar información cualitativa rápida sobre los modos de unión de los péptidos, pero generalmente fallan en estimar con precisión las afinidades del receptor debido a las aproximaciones intrínsecas del método. Por lo tanto, mediante el uso de dinámica molecular y métodos de punto final se puede calcular la energía libre enlace tomando la diferencia entre la energía libre absoluta del ligando en los estados enlazados y no enlazados. Estos métodos incluyen a MM-PBSA y MM-GBSA que ofrecen un equilibrio entre la eficiencia computacional y la precisión, y pueden usarse con éxito para predecir las afinidades de unión correctas para los sistemas proteína-péptido. [116]

1.8 Objetivos de la investigación

1.8.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad terapéutica de péptidos derivados de la piel de anfibios mediante herramientas bioinformáticas y corroborar los resultados mediante experimentación *in vitro*

1.8.2 Objetivos específicos

- Producir modelos de los complejos péptido-receptor mediante docking molecular

- Cuantificar las interacciones moleculares de los complejos péptidos-receptor utilizando métodos de punto final
- Validar los resultados bioinformáticas mediante experimentación *in vitro*

CAPITULO II: MARCO METODOLOGICO

2.1 Fuente de péptidos

En el presente estudio se analizaron tres péptidos derivados de la secreción cutánea de las especies de anfibios *Cruziohyla calcarifer* y *Agalychnis spurelli*. Las secuencias aminoacídicas fueron dilucidadas mediante clonación molecular y espectrometría de masas en tándem, en un estudio previo de Proaño-Bolaños (2016) [117]. Los péptidos control CZS-3 y RK-1 son biomoléculas que previamente fueron descritas y presentan actividad antimicrobiana y anticancerígena respectivamente. Además, se eligieron péptidos de tamaño mayor para observar cómo afectan en los sitios activos de menor tamaño [118,119]. Los péptidos fueron analizados de manera general mediante análisis bioinformáticas y de laboratorio para evaluar su posible actividad terapéutica (**Sección Anexos: Figura A1**).

Tabla 1. Secuencia y tamaño de los péptidos analizados y los de control. Los péptidos analizados fueron aislados de las especies *Cruziohyla calcarifer* (CC) y *Agalychnis spurelli* (AS) y presentan terminación amida (a).

Especie	Nombre	Secuencia	Tamaño
AS	Unknown-AS1	IIGMIPDLISMISKLa	15 aa
CC	Unknown-CC3	FLYSLPPFFa	9 aa
CC	Unknown-CC4	IYWISRKTa	8 aa
	CZS-3	GFLDVVKHIGKAALGAVTHLINQ**	23 aa
	RK-1	IDCSKVNLTAECS**	14 aa

** Péptidos control

2.2 Estrategia bioinformática

2.2.1 Acoplamiento molecular con CABSdock

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos se calcularon usando ExPasy, Pepcalc y Biosyn. Los receptores de interés fueron elegidos mediante revisión

bibliográfica[120,121]. En la actividad antimicrobiana se seleccionaron cinco receptores claves de tres organismos modelos; *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Tabla 2) que intervienen en la replicación del ADN y crecimiento de las células bacterianas. Por otro lado, en la actividad anticancerígena, los receptores seleccionados están involucrados en la proliferación de células tumorales y angiogénesis (Tabla 3). Todas las estructuras tridimensionales de los receptores fueron obtenidas de la base de datos de dominio público Protein Data Bank.

Tabla 2. Enzimas claves en la actividad antimicrobiana. La estructura tridimensional fue obtenida en la base de datos Protein Data Bank (PDB) y presentan una resolución menor a 2.5 Å.

Organismo	Enzima
<i>S. aureus</i>	Proteína de unión a acil-penicilina 2A (PDB:1MWT)
<i>E. coli</i>	ADN girasa B (PDB:4PRV)
	Proteína de unión a penicilina transglicosilasa 1B (PDB:3VMA)
<i>C. albicans</i>	Exo-B-(1,3)-glucanasa (PDB:1EQC)
	Proteinasa aspártica secretada (PDB:1EAG)

Tabla 3. Dianas moleculares en la actividad cancerígena. La estructura tridimensional fue obtenida en la base de datos Protein Data Bank (PDB) y presentan una resolución menor a 2.5 Å.

Ruta/objetivo
Quinasa del linfoma anaplásico humano (PDB:3AOX)
Quinasa VEGFR2 humana (PDB:3VHE)
GTPasa K-Ras (PDB:4LPK)
Proteína quinasa activada por mitógenos (PDB:6YZ4)
Polimerasa 1 de poli [ADP-Ribosa] (PDB:4ZZZ)

Los péptidos de anfibios y control (tabla 1) fueron acoplados con las dianas moleculares utilizando el software CABSdock que emplea simulaciones de grano grueso. El acoplamiento se lo realizará de manera global, ingresando el receptor, la secuencia aminoacídica del péptido y la estructura secundaria que fue determinada con el servidor Porter. CABSdock utiliza el método de grano grueso para las simulaciones, es decir, cada residuo de aminoácidos es agrupado para disminuir el número de átomos y conseguir que los acoplamientos requiere menor gasto computacional y tiempo. Posteriormente, el programa al terminar la simulación construye nuevamente todo el complejo producido mediante el programa Modeller. El programa finalmente agrupa los modelos producidos y nos muestra los 10 mejores modelos y se escogerá el primero según su puntuación de interacción.

2.2.2 Dinámica molecular

Los modelos de los complejos obtenidos se les realizaron una simulación de dinámica molecular en el programa Amber20 siguiendo el flujo de proceso de la Figura 1 y utilizando los diferentes módulos disponibles.

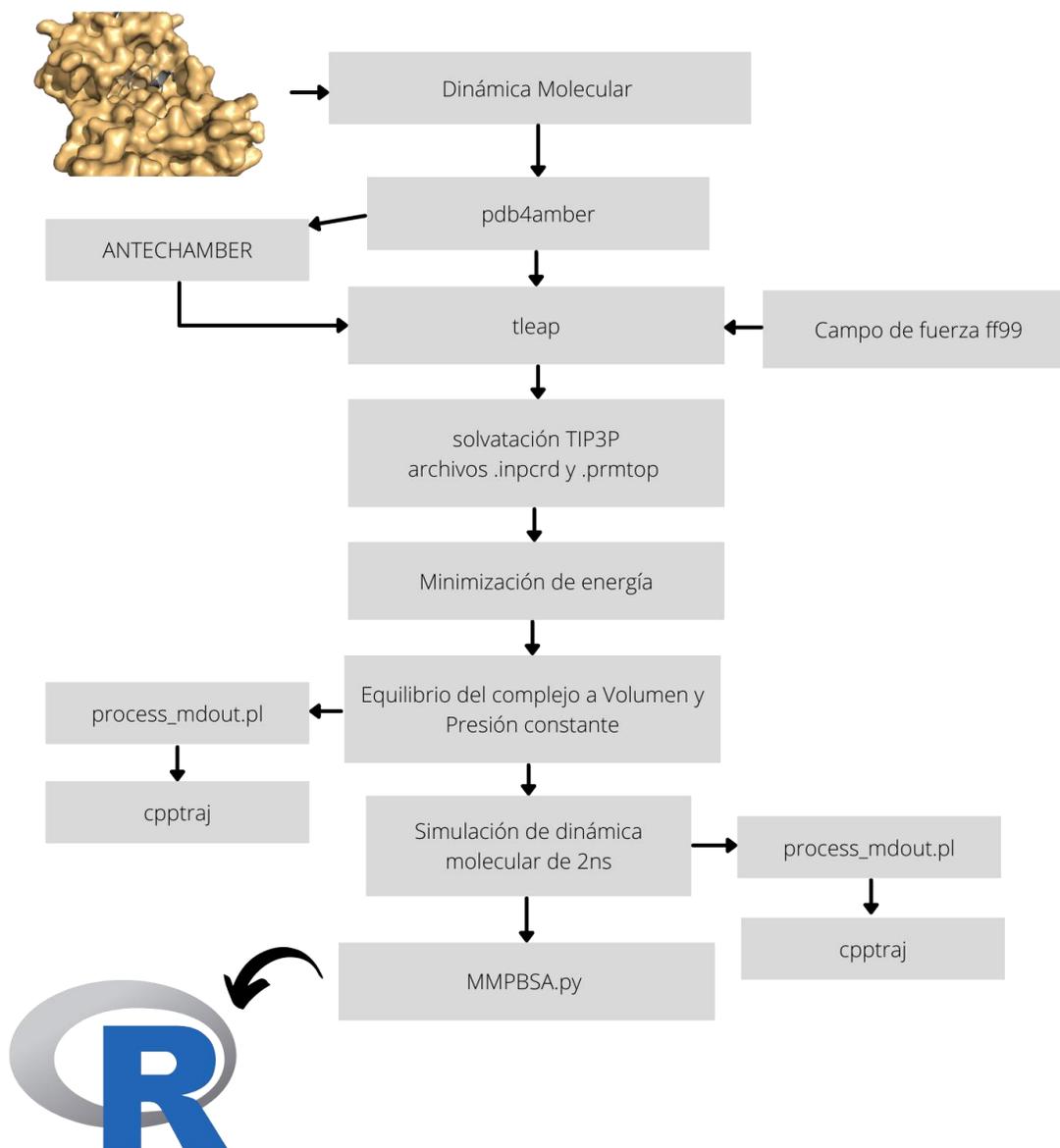


Figura 1. Flujo de proceso metodológico de las simulaciones de dinámica molecular. Los análisis *in silico* fueron realizados en el software Amber20 y graficados en el software R Studio.

Cada complejo producido se le realizó una limpieza de los archivos PDB mediante el módulo PDB4amber. Posteriormente, al complejo se lo colocó en un cuboide y se solvató mediante el modelo TIP3P a una distancia mínima del soluto y el borde de la caja de 12.0 angstrom. A continuación, se utilizó el módulo tleap para crear los archivos de topología

(prmtop) y de coordenadas (inpcrd) donde se utilizó campo de fuerza Amber ff99. En el caso de las simulaciones con los inhibidores conocidos se les realizó una parametrización mediante el módulo ANTECHAMBER para que el programa reconozca a la molécula y sus enlaces. Una vez obtenida todos los archivos se realizó una minimización del complejo mediante el método de steepest-descent, luego dos corridas de 50ps; la primera a volumen constante y la segunda a presión constante con restricciones débiles. Posteriormente, se realizó una simulación de 500ps de equilibrio a presión constante sin restricciones. Finalmente se realizó una simulación de 2 ns registrando una las coordenadas cada 10ps. Los gráficos de temperatura, densidad y energía total fueron obtenidos mediante el script process_mdout.pl. Por otro lado, para la obtención de los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) se utilizó el módulo cpptraj donde fueron ingresados los archivos de coordenadas de la dinámica molecular realizada. Los gráficos fueron producidos mediante el software bioestadística RStudio 1.4. En el caso del cálculo de afinidad de energía libre se utilizó el modulo MMPBSA.py, al cual se ingresaron los archivos de coordenadas del complejo solvatado, el complejo sin solvente, receptor, ligando y de los 200 registros obtenidos de la simulación.

2.3 Caracterización funcional

2.3.1 Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis de péptido en fase sólida se la realizó usando la estrategia FMOC. La resina a usar fue FMOC Rink amida (HL), para la desprotección de los grupos aminos se empleó piperidina 20%, para la formación de enlaces amidas 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 clivó del soporte sólido y se eliminaron todos los grupos protectores mediante una solución ácida de TFA: H₂O: TIPS: DODT (92.5%:2.5%:2.5%:2.5%). Luego, el péptido se precipitó con éter dietílico. Posteriormente, se liofilizó la muestra. Finalmente se realizó un análisis de pureza mediante RP-HPLC utilizando una columna C18. Se pesó 1.0 mg de péptido 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 1 mL/min durante 40 minutos. El método de detección fue dual a 214 y 280 nm (**Figura A2, Figura A3 y Figura A4**). Finalmente, se corroboró la masa molecular mediante MALDI-TOF MS (**Figura A5, Figura A6 y Figura A7**).

2.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Primero se realizó una disolución seriada de cada péptido a una concentración de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 mg/L disueltos en DMSO. Los organismos utilizados fueron *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. albicans* y estos se diluyeron en su fase exponencial hasta obtener 10^6 unidades formadoras de colonia. Luego, se colocó 2 microlitros de cada dilución del péptido en una placa estéril de 96 pocillos y se agregó 198 microlitros de la solución de microorganismo. En las pruebas de control se incluyeron; 2 microlitros de DMSO en lugar del péptido sintético y 198 μ l de cultivo para el control positivo y 200 μ l de caldo Mueller Hinton para el control negativo. Se realizaron 7 réplicas por concentración del péptido. Las placas con los pocillos se incubaron a 37°C durante 18 horas. Finalmente se realizó la medición de cada pocillo a 600 nm utilizando el lector de microplacas. La concentración mínima inhibitoria se calculó como aquella concentración mínima donde no creció el microorganismo.

2.3.3 Ensayos anticancerígenos

Se sembró una suspensión celular de 200 μ L que contenía 1×10^5 de cada línea celular, A549, HFF y HEK en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos durante 24h. A continuación, se desplazó el medio de cultivo y se colocó con una suspensión de péptidos a concentraciones 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M disueltos en PBS. Las células se cultivaron con las partículas durante 24h y 48h. Luego, se agregó 10 μ L de medio de tratamiento que incluía 5 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma, EE.UU.) en cada pocillo y se cultivó las células durante 3 h más, seguido se añadió SDS 10% y se leyó 24h después agitando la placa en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se detectó la densidad óptica (DO)/absorción de cada pocillo a 570 nm en el lector de microplacas. El control negativo fueron las células sin tratamiento y el control positivo fueron las células con 30% H₂O₂ y 100% DMSO. Se realizaron análisis de diferencia

estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado.

2.3.4 Ensayos de hemólisis

Primero, se extrajo alrededor de 2ml de sangre humana y se realizaron tres lavados mediante el PBS, posterior a cada lavado se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y se le retiró el sobrenadante. Luego, se añadió 50 ml de PBS para obtener una suspensión de glóbulos rojos al 4% y se probaron con las mismas diluciones seriadas de los péptidos disueltos en PBS. En este caso se incubó 200 μ L de los glóbulos rojos con 200 μ L de cada péptido durante 2 horas a 37°C. Después del periodo de incubación las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se transfirieron a placas de 96 pocillos. La actividad hemolítica se determinó a 550 nm. Se usó Triton X-100 (2% v / v) como control positivo y solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control negativo. Se realizaron análisis de diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Tukey: * $p \leq 0.05$ en comparación con el control positivo.

CAPITULO III: PRESENTACION DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Propiedades fisicoquímicas

Los tres péptidos amidados evaluados en este estudio presentan diversas propiedades fisicoquímicas (**Tabla 4.**). En resumen, estos péptidos presentan secuencias cortas de entre 8 a 15 aminoácidos, punto isoeléctricos (9.6 a 11.5), porcentaje de residuos hidrofóbicos (50 a 77.78%) y peso molecular (1065.21 a 1643.11). Los péptidos AS1 y CC3 presentan un carga neta +1, mientras que CC4 tiene una carga neta de +3.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los tres péptidos aislados de *A. spurelli* y *C. calcarifer*. Los péptidos presentaron carácter catiónico con un punto isoeléctrico básico

Parámetros	Unknown-AS1	Unknown-CC3	Unknown-CC4
Longitud (aa)	15	9	8
Peso molecular (g/mol)	1643.11	1145.39	1065.27
pI	10.14	9.6	11.47

Formula	$C_{75}H_{135}N_{17}O_{19}S_2$	$C_{62}H_{84}N_{10}O_{11}$	$C_{51}H_{80}N_{14}O_{11}$
Carga neta pH 7	1	1	3
% neutral aa	26.67	22.22	25
% basic aa	6.67	0	25
% acid aa	6.67	0	0
% hydrophobic aa	60	77.78	50

3.2 Docking molecular

La estructura secundaria fue obtenida mediante el servidor Porter, el cual muestra los resultados utilizando en formato DSSP. En el caso de los péptidos más largos CZS-3 y AS1 los resultados indicaron que los péptidos presentaban estructura alfa hélice. En los péptidos más cortos CC3, CC4 y RK-1 presentó una estructura que no es alfa hélice ni hoja beta (**Tabla 5**).

Tabla 5. Predicción de estructura secundaria de los tres péptidos utilizando el servidor Porter 5.0 utilizando el algoritmo DSSP.

Péptido	Estructura Secundaria
AS1	CCCCHHHHHHHHHHCC
CC3	CCCCCCCCC
CC4	CCCCCCCCC
RK-1	CCCCCCCCCCCCC
CZS-3	CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC

Los péptidos fueron acoplados a los receptores antibacterianos y anticancerígenos utilizando la técnica de acoplamiento global generando complejos péptido-receptor. En total se obtuvieron cuarenta acoplamientos de los complejos péptido-receptores mediante el programa CABSdock y diez complejos de los receptores de interés acoplados a los inhibidores conocidos descargados de la base de datos de Protein Data Bank. En resumen, en siete de los diez receptores utilizados los péptidos pudieron acoplarse en el sitio activo

correspondiente (**Figura 2, Figura 3, Figura 7, Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11**), de los cuales cinco correspondían a receptores cancerígenos y dos a receptores bacterianos. Los tres complejos restantes producidos fueron bacterianos y se infiere que fueron acoplados en el sitio alostérico (**Figura 4, Figura 5, Figura 6**), Además, se observó que el tamaño de los péptidos afectaba el sitio de unión al sitio alostérico, en péptidos cortos los acoplamientos se daban en el sitio activo.

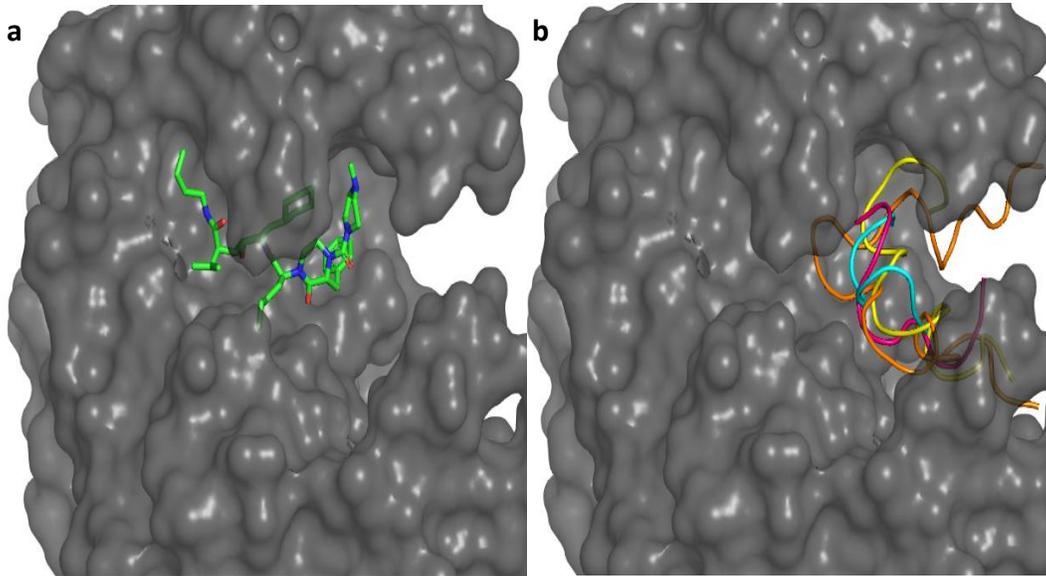


Figura 2. Sitio activo de la proteinasa aspártica secretada de *C. albicans* acoplada con a. inhibidor conocido A70 y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).

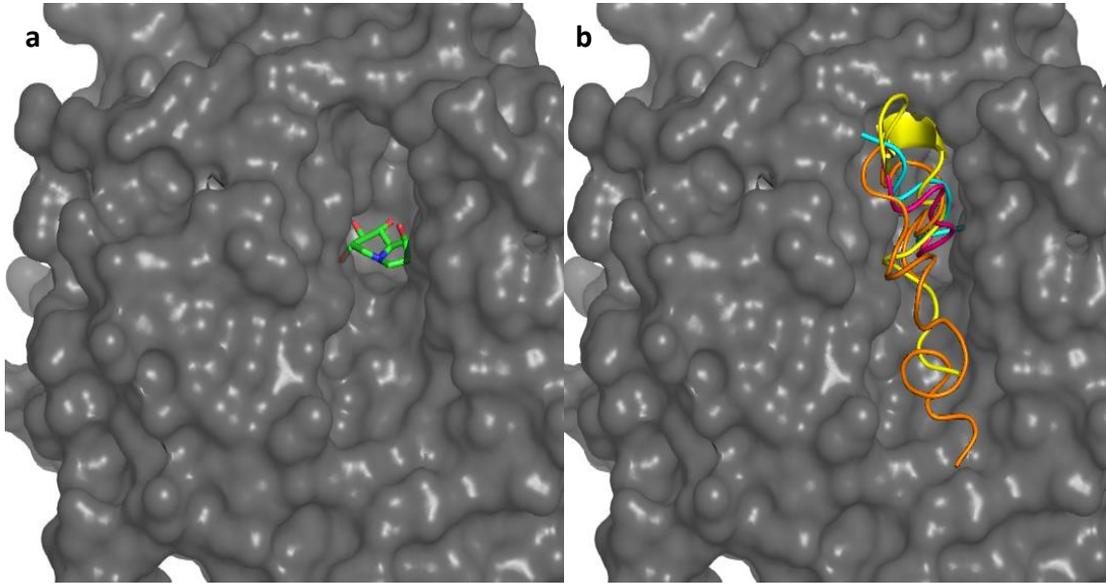


Figura 3. Sitio activo de Exo-B- (1,3) – glucanasa de *C. albicans* acoplada a. inhibidor conocido castanospermina y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).

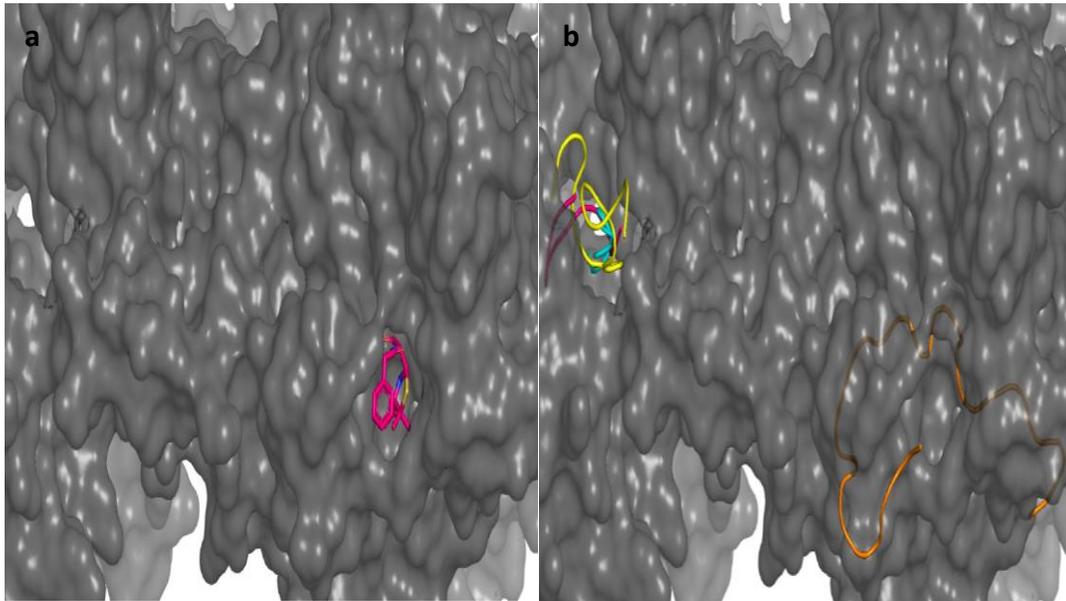


Figura 4. Sitio activo de la proteína de unión a penicilina 2A acoplada con a. inhibidor conocido penicilina y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).

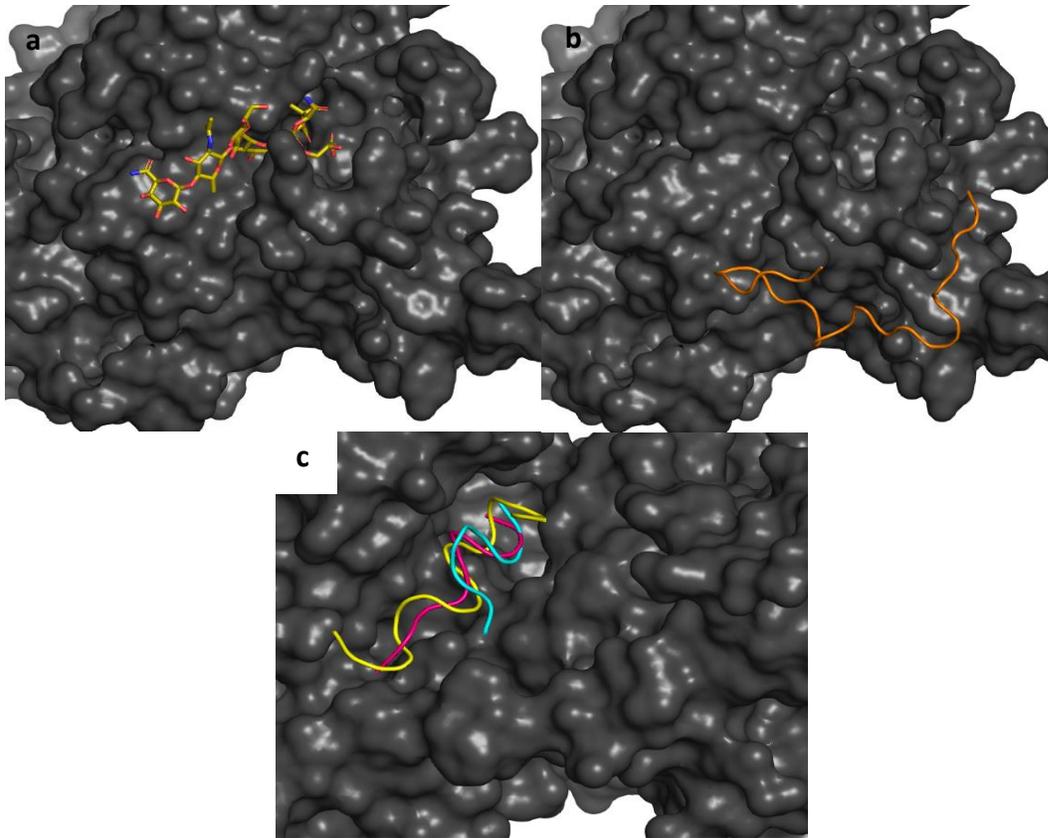


Figura 5. Sitio activo de la proteína de unión a penicilina transglicosilasa 1B acoplada con a. inhibidor conocido penicilina y b. CZS-3. Sitio de unión del receptor acoplado con c) los péptidos AS1 (amarillo), CC3 (morado) y CC4 (celeste).

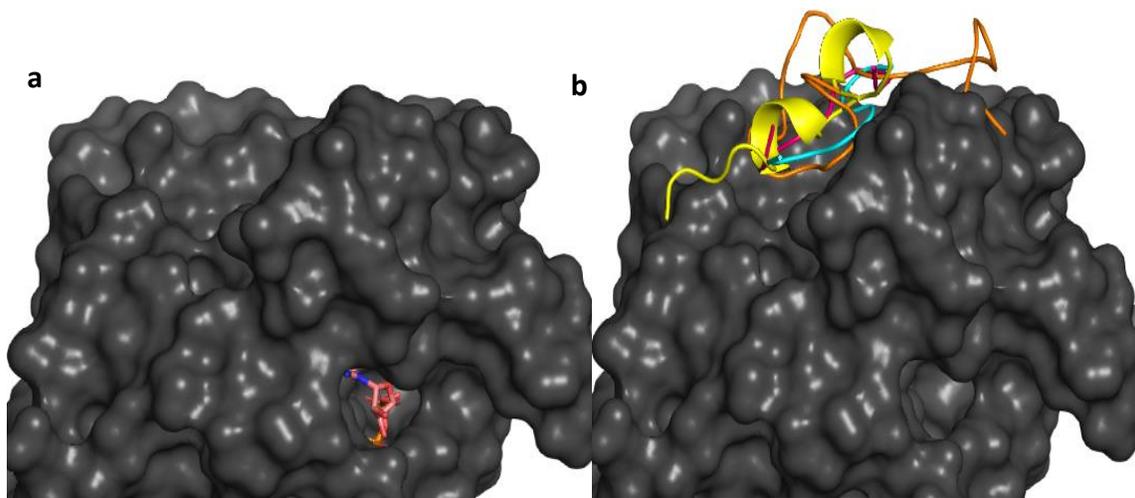


Figura 6. Sitio activo de ADN girasa B acoplada a. inhibidor conocido ADP y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y CZS-3 (naranja).

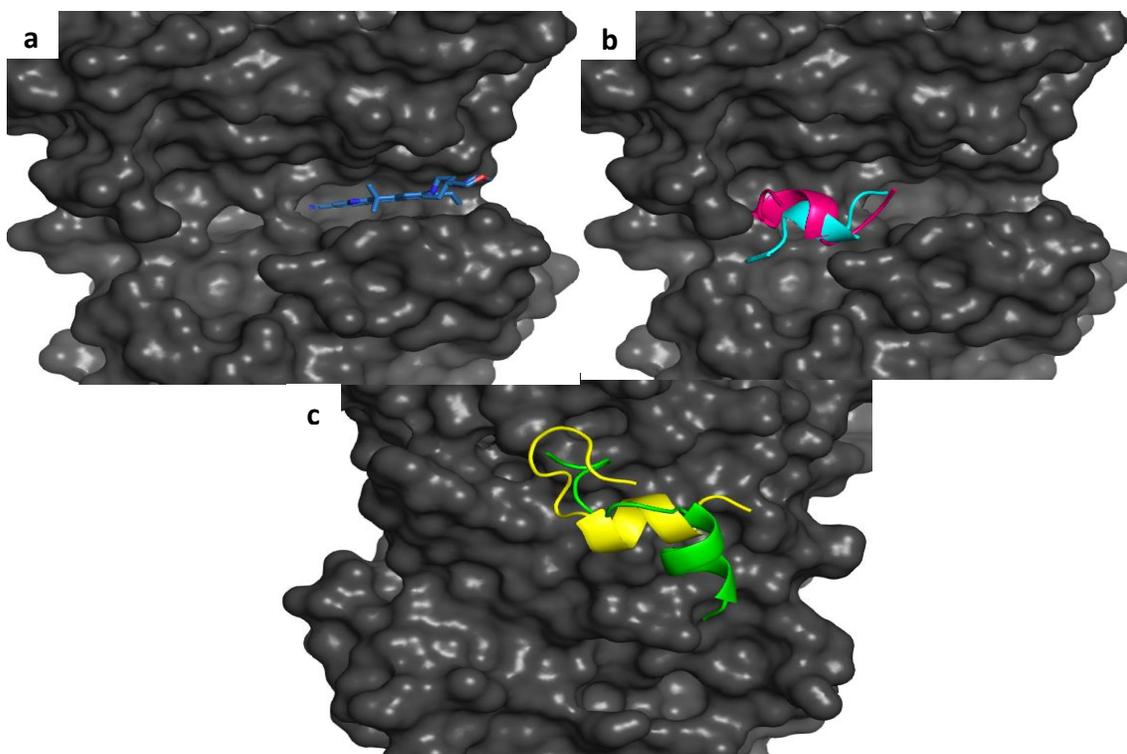


Figura 7. Sitio activo de quinasa del linfoma anaplásico humano acoplado con **a.** inhibidor conocido EMH y **b.** péptidos CC3 (morado) y CC4 (celeste). Sitio de unión del receptor acoplado con **c)** AS1 (amarillo) y RK-1 (verde).

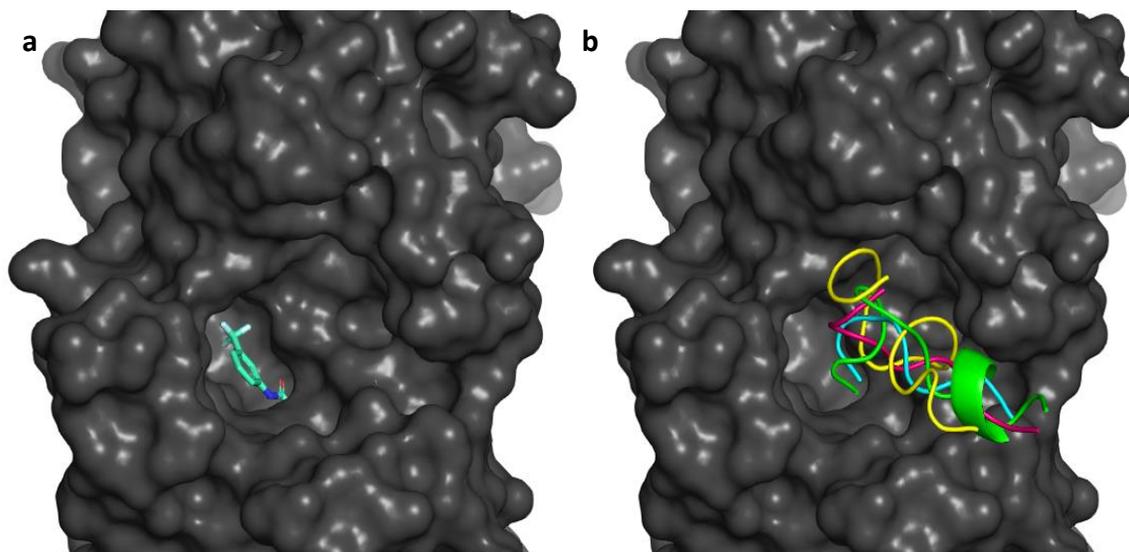


Figura 8. Sitio activo de quinasa VEGFR2 humana acoplado con **a.** inhibidor conocido pirrolopirimidina **b.** AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).

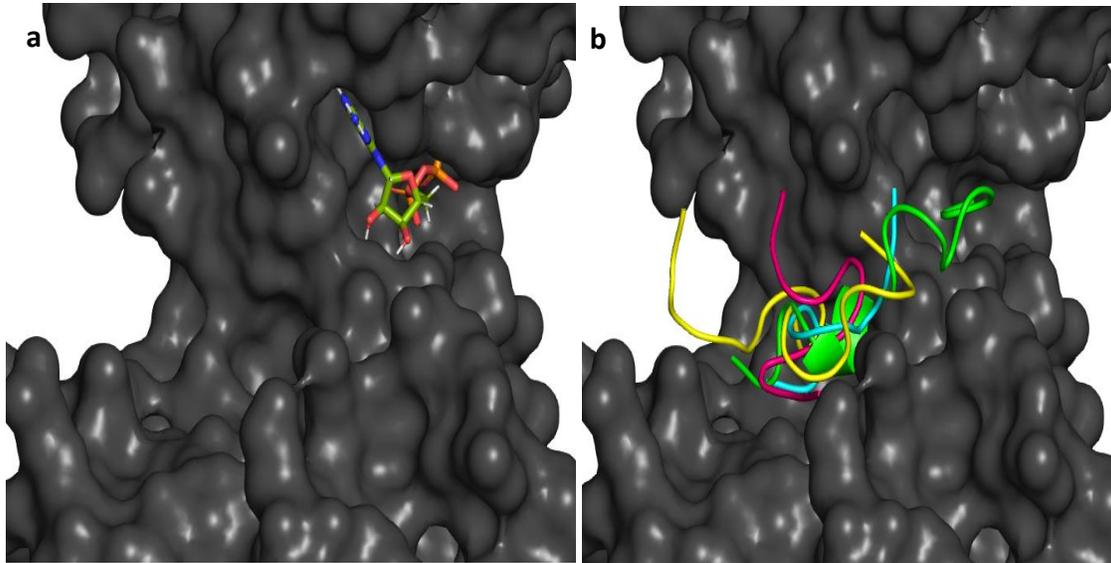


Figura 9. Sitio activo de GTPasa K-Ras acoplada a. Inhibidor conocido GDP y b. AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).

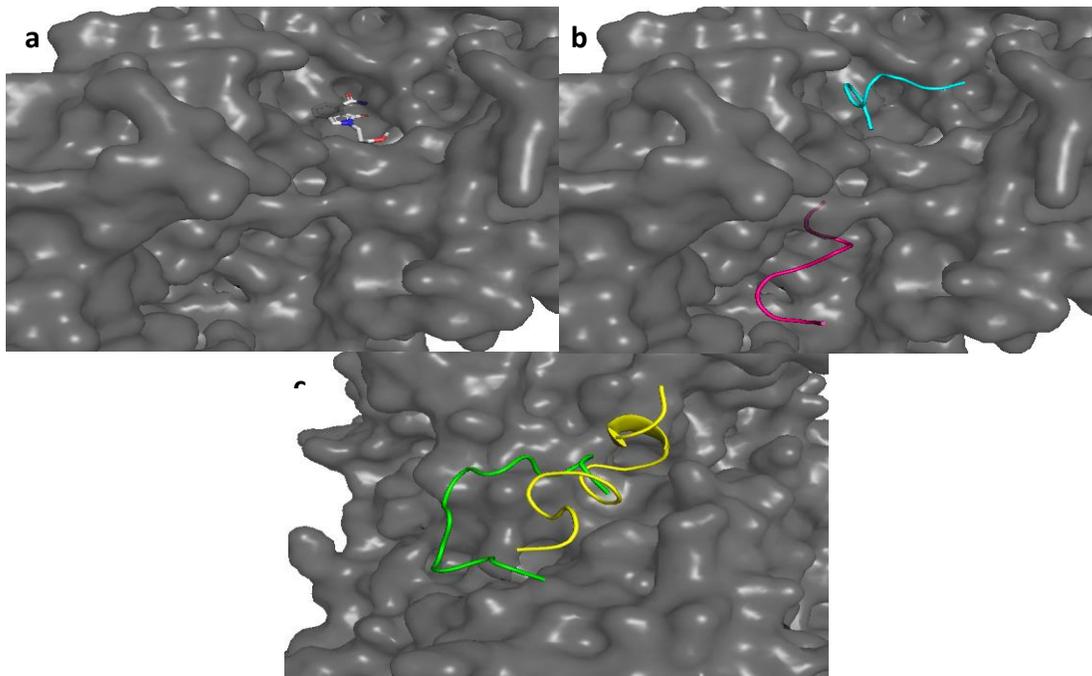


Figura 10. Sitio activo de la polimerasa 1 de poli [ADP-Ribosa] acoplada con a. Inhibidor conocido isoindolinona y b. Los péptidos CC3 (morado) y CC4 (celeste). Sitio de unión del receptor acoplado con c. AS1 (amarillo) y RK1 (verde).

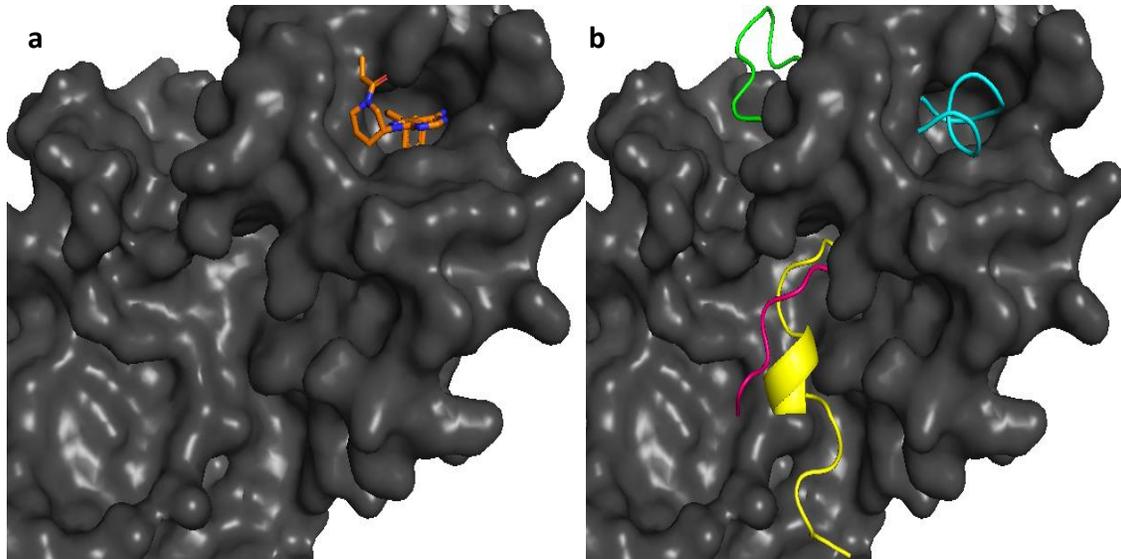


Figura 11. Sitio activo de proteína quinasa activada por mitógenos acoplada a. Inhibidor conocido ibrutinib, b. Los cuatro péptidos analizados; AS1 (amarillo), CC3 (morado), CC4 (celeste) y RK-1 (verde).

3.3 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular fueron de 2ns y se realizaron a todos los complejos péptidos-receptores producidos previamente. Los parámetros seleccionados para analizar que se realizó una correcta simulación fueron la densidad, energía, temperatura y RMSD. Los resultados de los péptidos-receptores analizados indicaron que en los parámetros de densidad ($\approx 1\text{g/cm}^3$) y temperatura (300 K) se obtuvieron valores similares en todos los complejos consiguiendo encontrar el equilibrio de los complejos (**Figura 12, Figura 16**). Los valores de energía fueron diferentes pero se encontró un rango de equilibrio adecuado (**Figura 13, Figura 14 y Figura 15**). Además, se observó que en el caso del parámetro RMSD los valores estuvieron entre 2.0 a 4.0 Å. Sin embargo, se encontró que en algunos complejos no se alcanza un rango de equilibrio adecuado (**Figura 17**). Los valores de RMSD fueron calculados utilizando como referencia las moléculas de carbono alfa, carbono y nitrógeno. En el caso de los péptidos utilizados en el control se tuvieron resultados similares y se encontró el punto de equilibrio en todos los parámetros analizados (**Figura A8, Figura A9, Figura A10, Figura A11, Figura A12, Figura A13, Figura A14 y Figura A15**).

3.3.1 Densidad

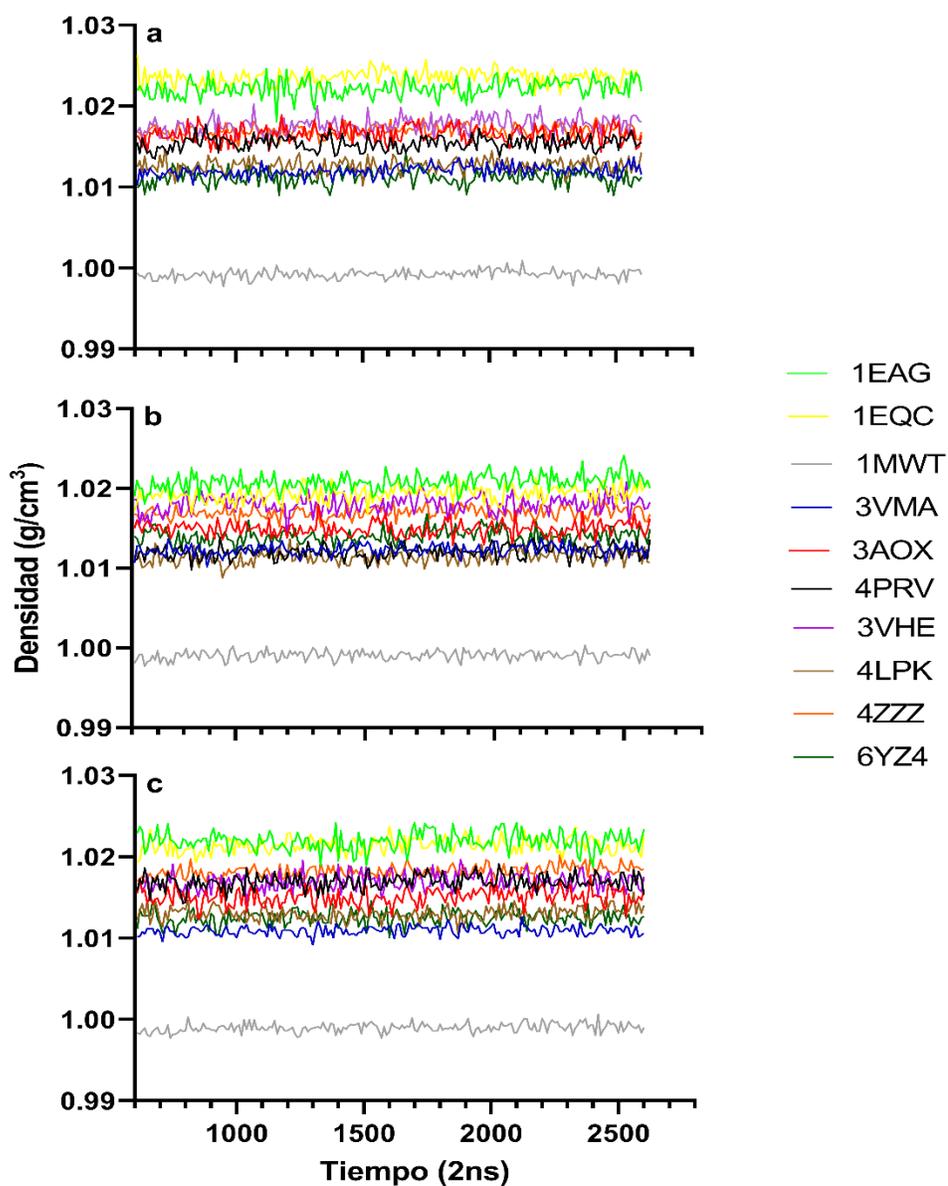


Figura 12. Parámetro densidad de los complejos de los péptidos sintéticos: a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores bacterianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

3.3.2 Energía Total

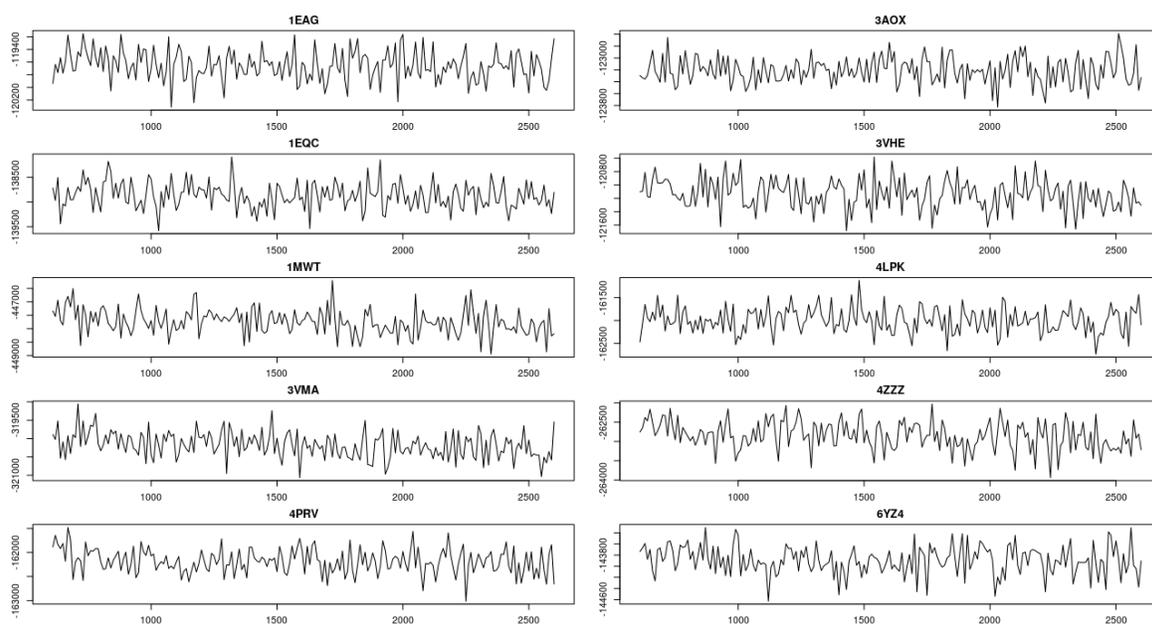


Figura 13. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido AS1 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

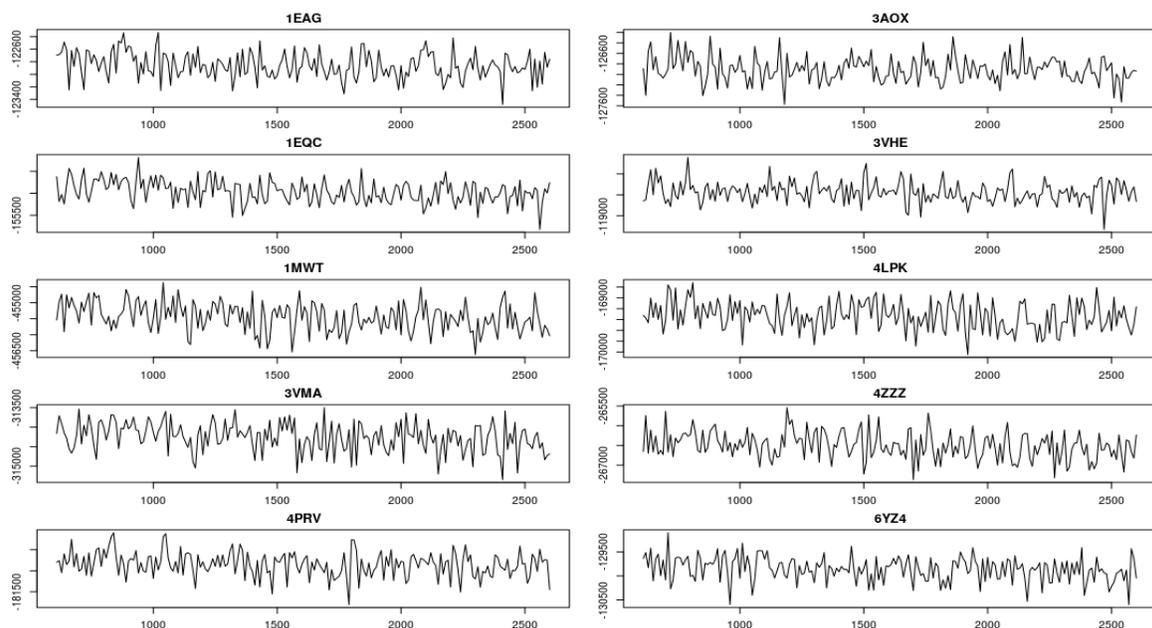


Figura 14. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido CC3 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

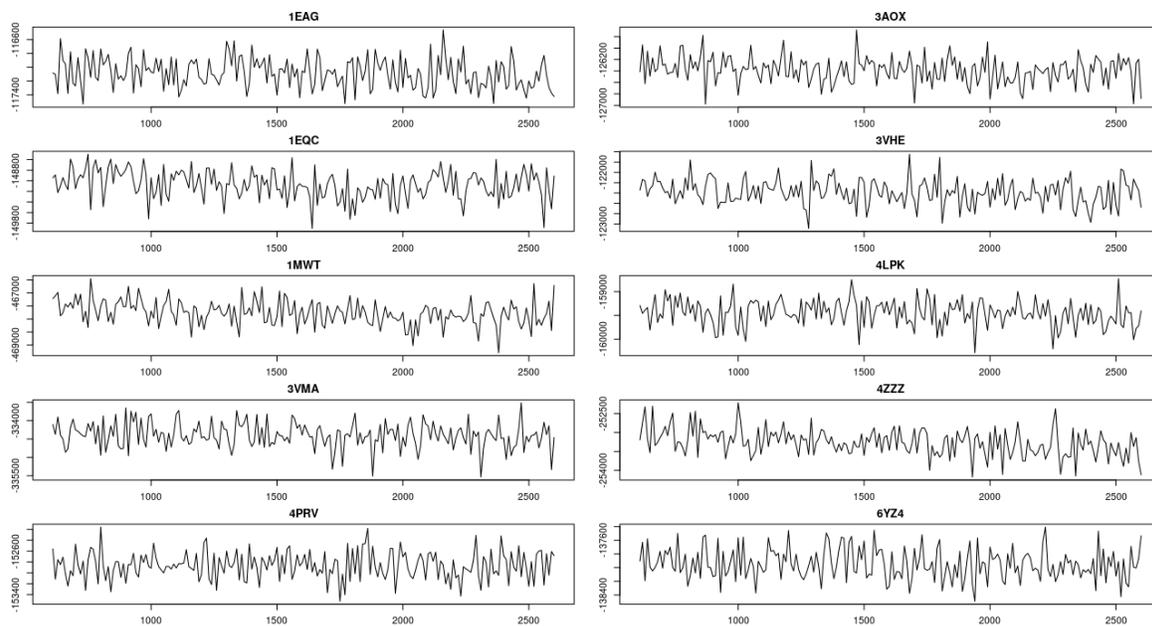


Figura 15. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

3.3.3 Temperatura

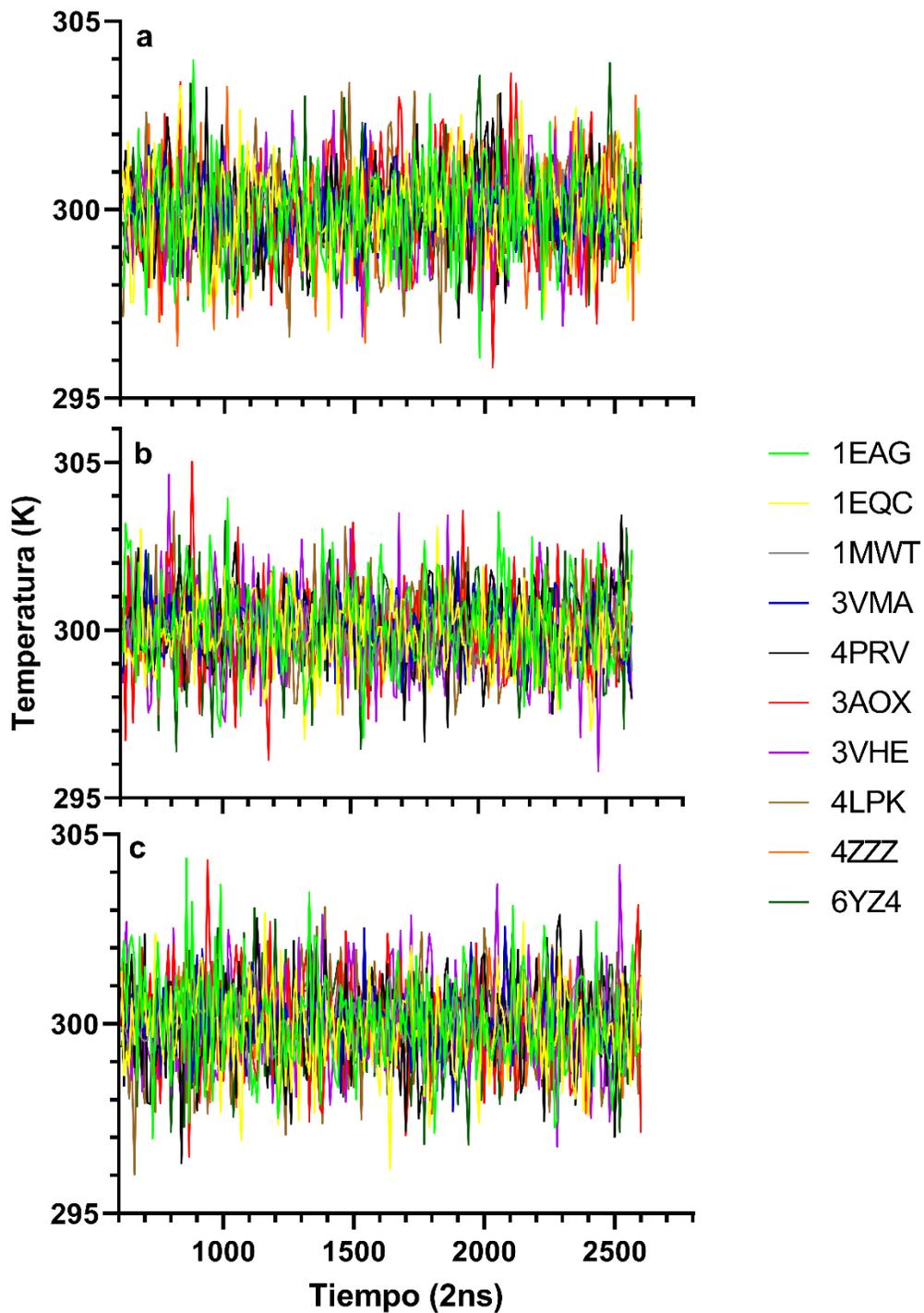


Figura 16. Parámetro de temperatura (K) de los péptidos sintéticos a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

3.3.4 RMSD

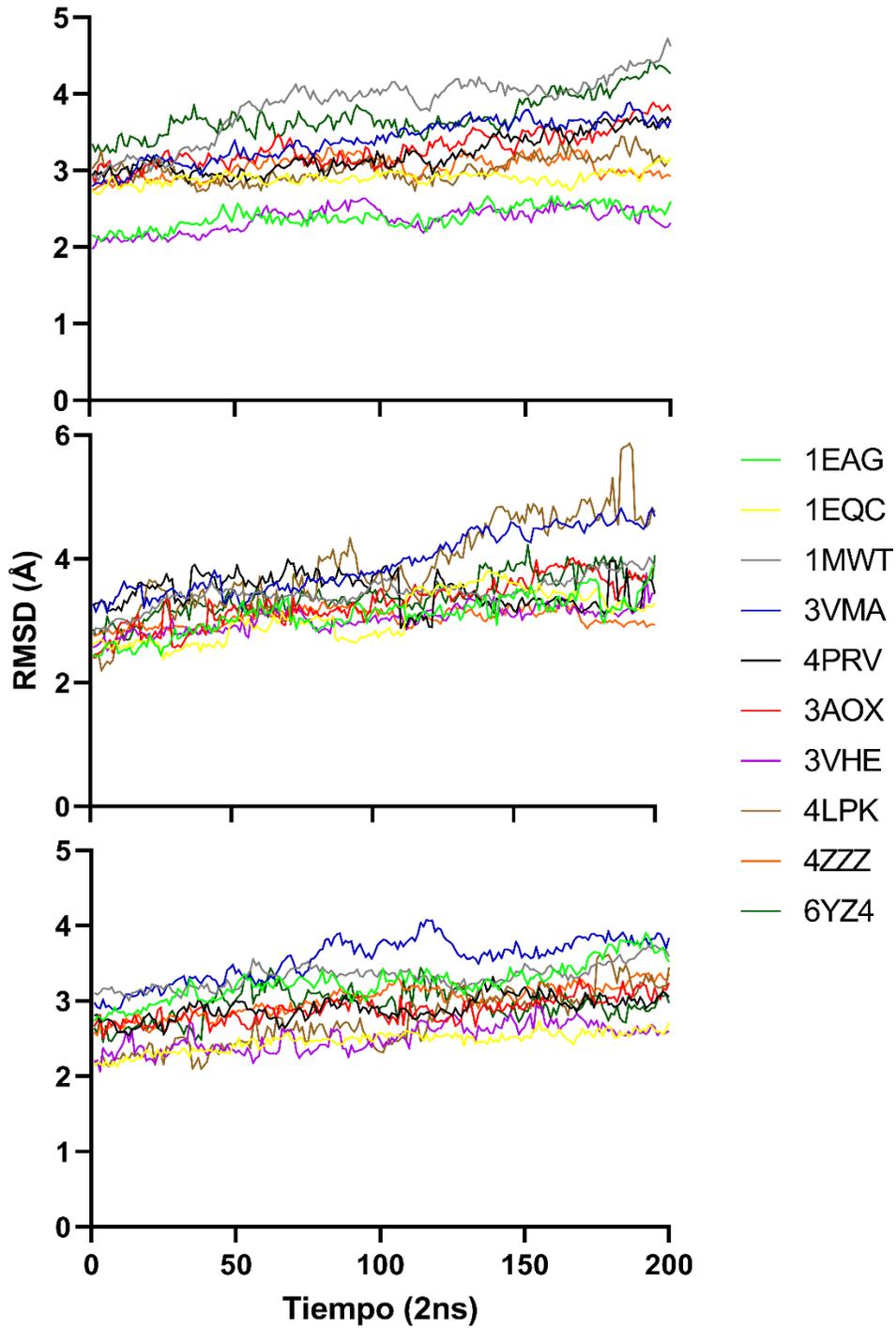


Figura 17. RMSD backbone (Å) de los péptidos sintéticos a) AS1, b) CC3 y c) CC4 contra los receptores microbianos y cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que los valores tendían a converger y alcanzar el equilibrio.

3.4 Energía libre de enlace

Los valores de energía de enlace fueron obtenidos utilizando dos métodos de punto final; MMGBSA y MMPBSA. En el caso de la cuantificación de receptores antimicrobianos se pudo determinar que existe identificación de los posibles péptidos candidatos, donde el péptido AS1 fue el que tuvo los valores de enlace más bajo, siendo el más prometedor. En el caso de los péptidos CC3 y CC4 la diferencia de valores fue menor y no se observó una diferencia en los valores de afinidad. En los análisis de los receptores cancerígenos la identificación fue menor aunque los valores más bajos fueron los de los péptidos AS1 y CC4, donde presentaron más afinidad en cuatro de los cinco receptores. Los valores entre ambos métodos de cuantificación de enlace fueron similares. Sin embargo, el método MMPBSA presento valores de desviación estándar más altos ($\approx 27.00 \text{ \AA}$).

Tabla 6. Valores de afinidad de enlace de receptores microbianos contra los péptidos estudiados utilizando MMGBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.

Target	AS1	SD	CC3	SD	CC4	SD	CZS-3	SD
1EAG	-36.8853	± 5.4184	-18.6388	± 5.1420	-19.1387	± 4.7175	-82.7324	± 9.7792
1EQC	-95.3689	± 5.9024	-44.0112	± 5.6117	-106.4538	± 4.9474	-55.6441	± 5.0701
1MWT	-47.4158	± 4.8869	-29.4849	± 4.2127	-27.1854	± 8.2783	-58.352	± 5.4122
3VMA	-105.0243	± 7.1847	-47.6295	± 6.4924	-37.8177	± 4.4441	-46.8479	± 14.384
4PRV	-23.6503	± 5.0594	-17.7921	± 4.5718	-12.0135	± 4.9413	-32.835	± 4.2424

La unidad de los valores de afinidad es (kcal/mol)

Tabla 7. Valores de afinidad de enlace de receptores microbianos contra los péptidos estudiados utilizando MMPBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.

Target	AS1	SD	CC3	SD	CC4	SD	CZS-3	SD
1EAG	-34.8433	±9.4796	-27.993	±6.15	-28.677	±7.2317	-79.2917	±12.3542
1EQC	-24.7296	±15.3785	-18.9787	±12.5861	-99.8728	±9.5214	-48.0021	±8.7539
1MWT	-59.5073	±6.4447	-20.412	±6.2683	-34.9067	±11.7212	-47.4447	±14.7802
3VMA	-94.5323	±9.5886	-45.3276	±6.3608	-37.631	±7.4146	-52.399	±13.2023
4PRV	-25.295	±8.3678	-19.3683	±4.9647	-15.4871	±8.318	-32.2561	±6.3513

La unidad de los valores de afinidad es (kcal/mol)

Tabla 8. Valores de afinidad de enlace de receptores cancerígenos contra los péptidos estudiados utilizando MMGBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada.

Target	AS1	SD	CC3	SD	CC4	SD	RK-1	SD
3AOX	-26.6426	±5.1716	-9.5978	±5.6477	-34.9499	±4.8919	-5.5007	±4.1194
3VHE	-29.0087	±7.1531	-39.6811	±6.3565	-39.784	±5.1214	-48.7695	±6.3181
4LPK	-51.4117	±7.1505	-21.7719	±4.5144	-20.1246	±4.9121	-48.3817	±6.9192
4ZZZ	-12.1443	±17.8307	-70.7349	±4.8783	-42.0305	±6.1363	-32.014	±11.2535
6YZ4	-68.1623	±7.1663	-22.994	±5.8663	-46.4062	±6.3682	-33.3332	±9.3476

La unidad de los valores de afinidad es (kcal/mol)

Tabla 9. Valores de afinidad de enlace de receptores cancerígenos contra los péptidos estudiados utilizando MMPBSA. Los valores de SD fueron obtenidos a través de las 200 capturas obtenidas colectadas de la simulación de 2ns realizada

Target	AS1	SD	CC3	SD	CC4	SD	RK-1	SD
3AOX	-31.5943	±6.0789	-16.2710	±4.2402	-31.5972	±7.4562	-2.9701	±8.2714
3VHE	-26.2057	±6.5019	-47.6141	±9.2938	-27.6822	±7.6809	-51.5538	±7.1494
4LPK	-45.3432	±6.8703	-25.8477	±6.4253	-24.1361	±6.6686	-46.1631	±9.9898
4ZZZ	-5.9030	±27.7630	-45.2963	±6.8599	-59.7310	±7.6034	-35.0267	±9.8387
6YZ4	-62.8072	±8.1543	-26.3908	±6.2393	-38.4594	±9.7424	-20.7213	±15.4799

Unidad de los valores de afinidad es (kcal/mol)

3.5 Concentración mínima inhibitoria

La evaluación de actividad antibacteriana fue evaluada mediante concentración mínima inhibitoria. Los péptidos AS1 y CC4 fueron los que presentaron actividad antimicrobiana a distintas concentraciones. El péptido AS1 mostro actividad en los tres patógenos utilizados; a concentración de 512 mg/L contra *C. albicans* y *E. coli*, en cambio que para *S. aureus* presento actividad a 256 mg/L (**Figura 18**). Por otro lado, el péptido CC4 mostró actividad únicamente antibacteriana a una concentración 1024 mg/L contra *E. coli* y *S. aureus* (**Figura 19**). En el caso del péptido CC4 no presento actividad antimicrobiana con ningunos de los microorganismos evaluados (**Figura A16**).

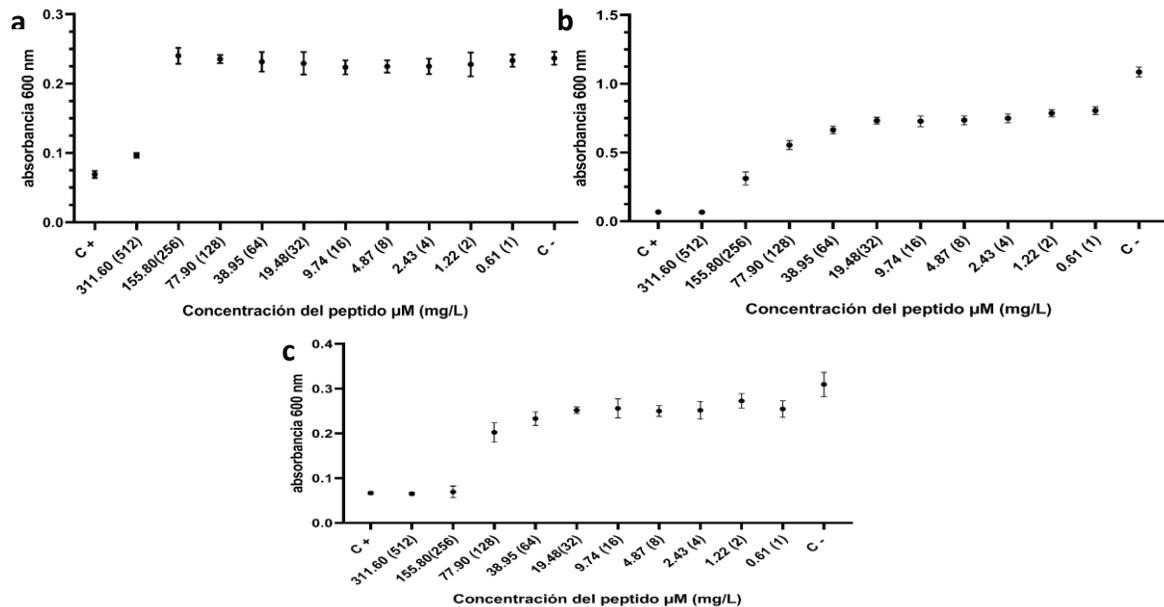


Figura 18. Concentración mínima inhibitoria del péptido sintético AS1 contra **a. *C. albicans***, **b. *E. coli*** y **c. *S. aureus***. Los microorganismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de péptidos desde 1 a 512 mg/L. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

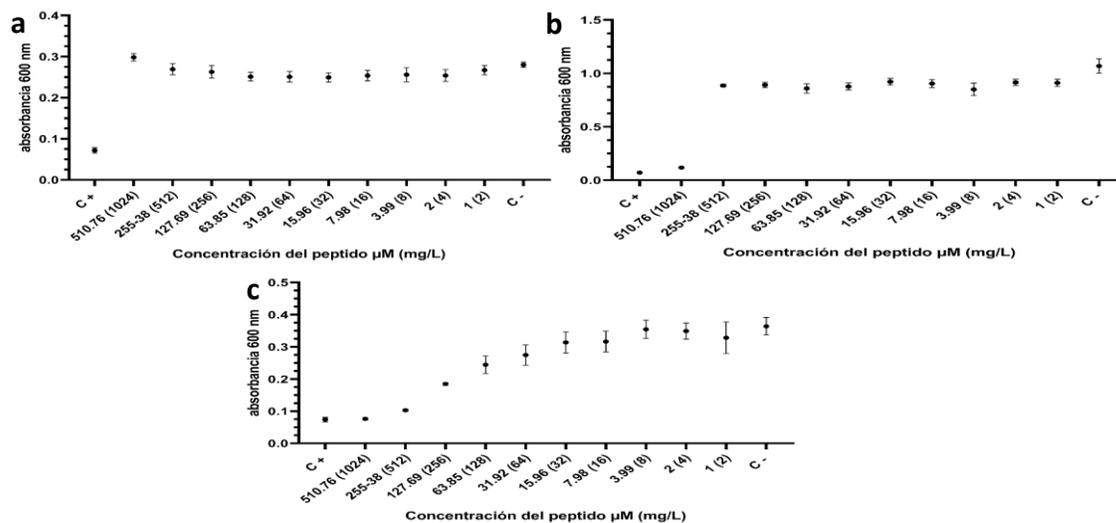


Figura 19. Concentración mínima inhibitoria del péptido sintético CC4 contra a. *C. albicans*, b. *E. coli* y c. *S. aureus*. Los microorganismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de péptidos desde 2 a 1024 mg/L. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.6 Ensayos anticancerígenos

La evaluación de la actividad anticancerígena fue evaluada mediante ensayos MTT. Los péptidos fueron evaluados a tres distintas concentraciones 10 μM , 100 μM y 500 μM con tres líneas celulares A549, HFF y HEK 2937. Los resultados indican que a 500 μM todos los péptidos presentaron actividad anticancerígena significativa $p < 0.001$ comparada con el grupo control no tratado. Sin embargo, los valores más bajos a 500 μM fueron los del péptido AS1 (**Figura 20**, **Figura 21** y **Figura 22**).

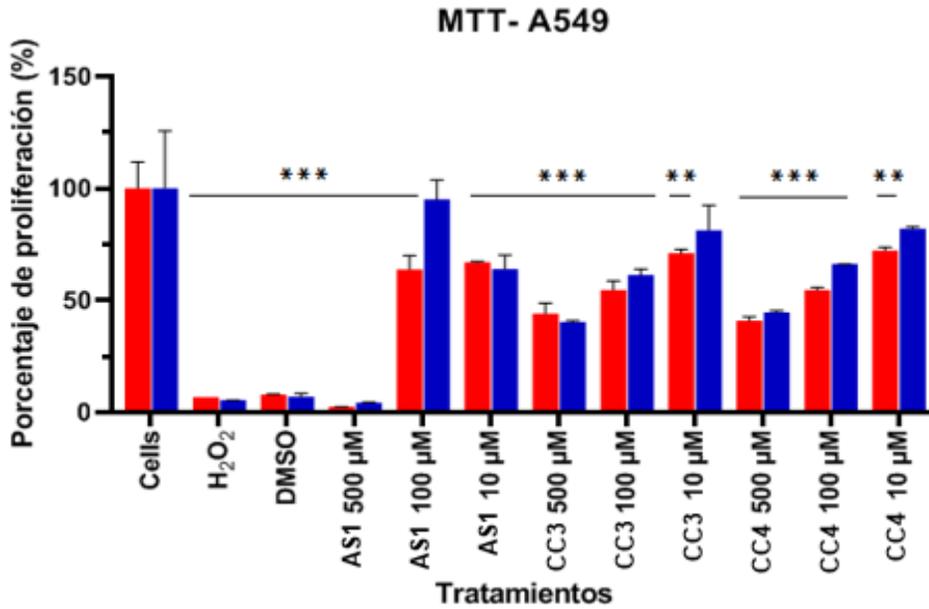


Figura 20. Viabilidad celular de A549 mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado.

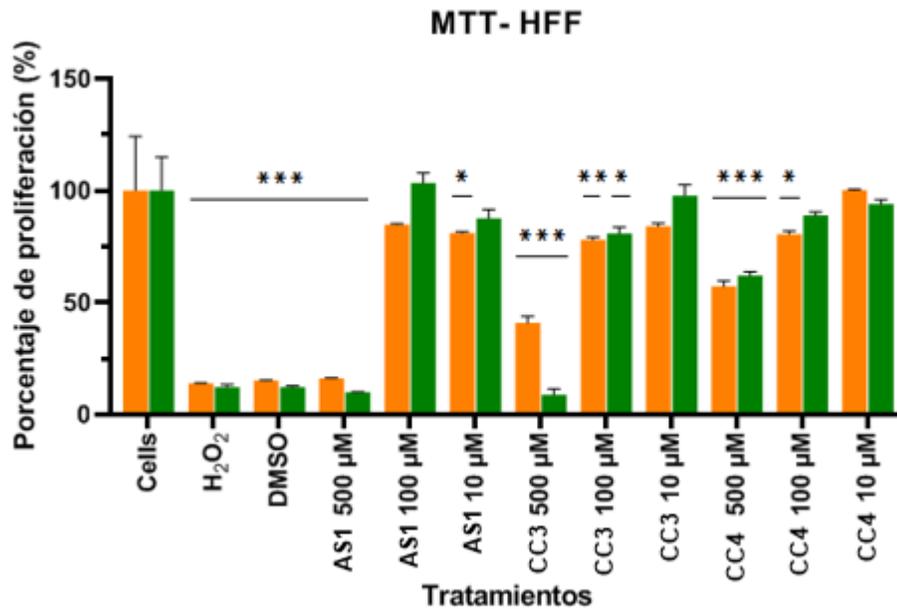


Figura 21. Viabilidad celular de HFF mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado.

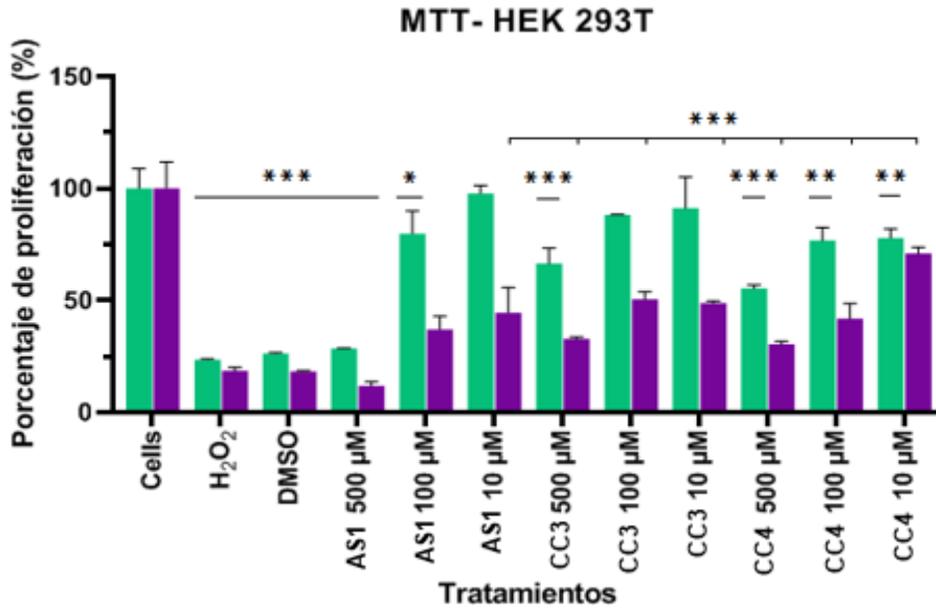


Figura 22. Viabilidad celular de HFF mediante ensayo MTT de los péptidos AS1, CC3 y CC4. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc de Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ en comparación con el control no tratado.

3.7 Ensayos hemolíticos

Las evaluaciones de toxicidad fueron evaluadas mediante ensayos hemolíticos. El péptido AS1 presentó un alto porcentaje de hemólisis a concentración de 512 y 1024 mg/L comparado con los grupos de control (**Figura 23**). Los péptidos CC3 y CC4 no presentaron actividad hemolítica (**Figura 24, Figura A17**).

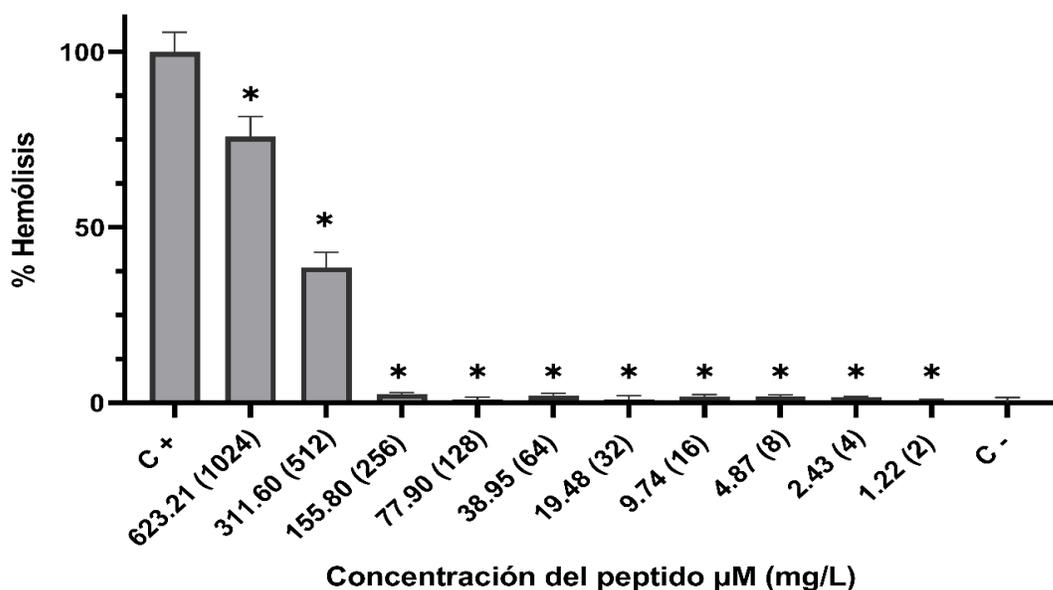


Figura 23. Porcentaje de hemólisis del péptido AS1. El péptido presentó hemólisis desde 512 mg/L. El control positivo (Triton X-100) fue considerado como el 100% de hemólisis. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc Tukey (* $p \leq 0.05$).

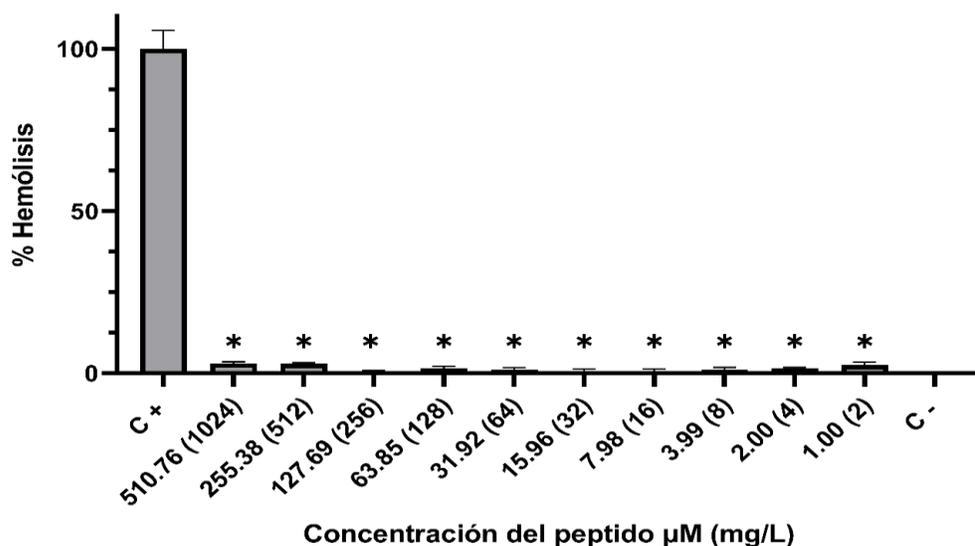


Figura 24. Porcentaje de hemólisis del péptido CC4. El péptido no superó el 3% de disrupción celular en las distintas concentraciones. El control positivo (Triton X-100) fue considerado como el 100% de hemólisis. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc Tukey (* $p \leq 0.05$).

CAPITULO IV: INTERPRETACION Y DISCUSION

Los predictores de propiedades fisicoquímicas, indican que los tres péptidos huérfanos AS1, CC3 y CC4 son de cadena corta (entre 8 a 15 aminoácidos) con uno a dos aminoácidos positivos. Estos valores le confieren características básicas que se ven reflejadas en su punto isoeléctrico (pH de 9.6 a 11.47) y carga neta (+1 a +3) [121]. La estructura secundaria de los péptidos CC3, CC4 y RK-1 que indico que no es alfa hélice ni hoja beta puede deberse a que son secuencias cortas que no forman una estructura secundaria regular. De hecho, está limitada información genera que los servidores no pueden analizar adecuadamente [122].

Los resultados de acoplamiento global indicaron que es posible que los péptidos interaccionen con los receptores en dos lugares; en el sitio activo o en el alostérico [123]. En el conjunto de complejos producidos se observa que en siete de los diez receptores utilizados, los péptidos se unieron al sitio activo, donde en la mayoría de los casos todos los péptidos estudiados se enlazaban en el mismo lugar. En el caso de los acoplamientos en lugares distintos al sitio activo, los sitios de unión eran diferentes según el péptido, donde por lo general aquellos péptidos que poseen más aminoácidos se unen a distintos sitios. Por ejemplo, en el caso del péptido control utilizado en los receptores bacterianos CZS-3 que posee una longitud de 23 aminoácidos, se observó que en ciertos casos no se acoplaba en el mismo lugar que los péptidos más pequeños [121]. Esto quizás pueda ocurrir por el impedimento estérico en el sitio activo o por imprecisiones en el algoritmo de búsqueda del software, debido a que péptidos de mayor tamaño poseen más enlace de rotación que pueden ocasionar errores[124,125]. Resultados similares se obtuvieron en los receptores cancerígenos, donde los péptidos AS1 y RK-1 de 15 y 14 aminoácidos respectivamente; se acoplaban en el mismo sitio pero diferentes a los acoplamientos de péptidos de menor tamaño, debido a que ambos poseen tamaños similares. En el caso de 3 de los 4 receptores de acoplamiento diferente al sitio activo, la actividad alostérica es supuesta, debido a que no se puede demostrar que el sitio de unión presenta importancia biológica. Sin embargo, mediante revisión en la base de datos PDB se determinó que en el caso del receptor G

proteína de unión a acilpenicilina 2A (1MWT) posee un sitio alostérico, donde se comprobó que los péptidos AS1, CC3 y CC4 se unían en el mismo [126].

En las simulaciones de dinámica molecular se pudo medir la estabilidad de los complejos mediante la medición de diferentes parámetros tales como la densidad, energía total, temperatura y RMSD. En el caso de la densidad, energía total y temperatura se determinó que en todos los casos el complejo llega a un punto de equilibrio donde los valores entran en un rango de variación mínimo, indicando la estabilidad (. En el caso de los gráficos de RMSD, los resultados indicaron que las simulaciones en la mayoría de los complejos encontraban un punto de equilibrio y los valores entraban dentro de un rango aceptable (2.0 a 3.5 Å) [122]. Sin embargo, en algunos complejos los valores no encontraban el punto de equilibrio y presentaron valores altos, tales como AS1-1MWT, AS1-3AOX, CC3-4LPK, CC3-3VMA y CC4-4LPK. Estos resultados podrían deberse a dos motivos: la diferencia en el número de átomos y el tiempo de simulación. Los receptores utilizados poseen diferentes números de átomos (2323 a 10137), esto podría ocasionar las diferencias mostradas en RMSD. En un estudio realizado por Sargsyan y colaboradores [127] demostraron que con un menor número de átomos, el RMSD era más alto. Pero esto únicamente ocurrió en AS1-3AOX que es un receptor relativamente pequeño que presenta 2355 átomos. Por lo tanto, la razón más factible es que el tiempo de 2ns es corto y los complejos antes mencionados no pudieron alcanzar el equilibrio adecuado [128].

En el caso del cálculo de la afinidad de unión de los complejos péptidos receptor se pudo identificar que el péptido AS1 fue el más prometedor y que puede presentar actividad antimicrobiana o anticancerígena. Para los receptores microbianos, los resultados mostraron que AS1 es el péptido más favorable debido a que en cuatro de los cinco receptores fue el que mostró mayor afinidad de enlace, seguido del péptido CC4 que presentó mayor afinidad por uno de los receptores. De hecho, AS1 y CC4 presentaron los valores de afinidad de enlace más elevados en el conjunto de simulaciones con -105.0243 y 106.4538 kcal/mol respectivamente. Los resultados fueron similares utilizando ambos métodos de punto final MMPBSA y MMGBSA con algunas diferencias debido al método de cálculo de la superficie de solvatación [129]. Por otro lado, en el caso de las simulaciones

para identificar la actividad anticancerígena los resultados fueron menos precisos. Sin embargo, en los cálculos obtenidos, los péptidos AS1 y CC4 fueron los que mostraron mejores resultados, ambos fueron los más favorables para cuatro de los cinco receptores analizados, el restante fue para el péptido CC3. En ambos métodos usados presentaron valores relativos similares. De esta manera, se puede entender que el péptido más prometedor en presentar actividad antimicrobiana y anticancerígena es el péptido AS1. Entre los péptidos CC3 y CC4 la identificación de los valores no es clara y no se puede estimar cuál podría ser el más prometedor. Dentro de los dos métodos, la más indicada sería el MMGBSA debido a que los valores son más cercanos a la media y el gasto de recursos computacionales es menor [105].

Los ensayos experimentales han permitido corroborar los análisis bioinformáticos. Los resultados indicaron que el péptido AS1 mostró mejores propiedades antimicrobianas contra los tres microorganismos evaluados; *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. La concentración mínima inhibitoria contra *C. albicans* y *E. coli* fue de 311.60 μM (512 mg/L) y presentó un valor de 155.80 μM (256 mg/L) para *S. aureus*. Los péptidos CC3 y CC4 no mostraron actividad antimicrobiana y fueron evaluados a una concentración más elevada, donde el péptido CC4 presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 510.76 μM (1024 mg/L) y 255.38 (512 mg/L) respectivamente. La posible actividad terapéutica presentada por los péptidos AS1 y CC4 se podría deberse a dos principales mecanismos de acción de los péptidos; membranolítico o inhibitorio [5].

En las evaluaciones anticancerígenas se aprecia que los tres péptidos evaluados inhibieron la proliferación de las tres líneas celulares; A549, HFF y HEK 293T a una concentración de 500 μM presentando diferencias significativas de $p < 0.001$ comparadas con el control negativo. Sin embargo, los valores más bajos de porcentaje de proliferación se observaron en AS1 validando los resultados bioinformáticos. Confirmando de esta manera al AS1 como un candidato terapéutico que presenta propiedades similares la de un péptido anticancerígeno (ACP). Los ACP presentan varios mecanismos de acción entre los que destacan destrucción de la membrana celular, apoptosis, inhibición de angiogénesis

tumoral y regulación inmune [130]. Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, como la carga neta, podría presentar principalmente una actividad membranolítica y por la afinidad a los receptores claves cancerígenos, tales como GTPasa K-Ras y proteína quinasa activada por mitógeno una actividad inhibitoria [131,132] .

Los resultados indicaron que el péptido AS1 es un candidato prometedor que puede presentar actividades terapéuticas, tales como antimicrobiano y anticancerígeno. Sin embargo, los péptidos antimicrobianos presentan ciertas limitaciones. De hecho, el problema que ocurre con mayor frecuencia es el daño en la membrana celular eucariota causando efectos secundarios hemolíticos. Esta limitación fue comprobada cuando se evaluó a los péptidos analizados contra los ensayos hemolíticos. Los resultados indicaron que el péptido AS1 presenta un alto porcentaje de hemólisis a 1024 y 512 mg/L, las mismas que presento actividad antimicrobiana. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas en el área de diseño de péptidos antimicrobianos que se enfoca en cinco aspectos: tamaño de la cadena, estructura secundaria, carga neta, hidrofobicidad y anfifilicidad. Las mismas estrategias se pueden aplicar para el péptido CC4 que no presentó hemólisis en los ensayos, pero es necesario aumentar la actividad antimicrobiana y anticancerígena a menores concentraciones (Figura 24) [8,133].

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la presente investigación se pudo crear una metodología novedosa que involucra a diferentes programas bioinformáticas que anteriormente no han sido utilizados conjuntamente, como es el caso de Porter, CABSdock y Amber para poder evaluar a péptidos candidato con potencial terapéutico. El acoplamiento molecular funcionó adecuadamente en la mayoría de las interacciones, especialmente en péptidos más cortos donde la tendencia a errores es menor. De la misma manera, la dinámica molecular encontró el punto de equilibrio en la mayoría de las biosimulaciones, pero es necesario que el número de átomos de los receptores sean similares para poder tener mejores resultados y estandarizar el método. Ambos métodos de punto final utilizados para calcular la energía de enlace tuvieron resultados relativos similares, pero el más adecuado para futuras

estimaciones es MMGBSA debido a que presentó valores más cercanos al promedio y el gasto computacional es menor, disminuyendo el tiempo de cálculo.

Todas las herramientas antes mencionadas funcionaron adecuadamente y se pudo identificar al péptido AS1 de los tres péptidos que presentaban función biológica desconocida debido a que no pertenecen a ninguna familia anteriormente descrita. Los ensayos *in vitro* permitieron validar los resultados y demostrar que la metodología exploratoria utilizada podría ser aplicada en futuras biomoléculas. Además, será necesario estandarizar una metodología de herramientas bioinformáticas para englobar todas las variables, tales como un mecanismo inhibitorio y la toxicidad de los péptidos. Una posible alternativa podría ser la creación de membranas celulares eucariotas y bacterias con la utilización de diversas estrategias tales como *umbrella sampling* para cuantificar la energía enlace. Sin embargo, cuando se trabaja con membrana y dinámica molecular los complejos son más grandes e involucra mayor gasto computacional.

La verificación del mecanismo inhibitorio será necesario analizar mediante la comparación del valor de energía de enlace de los péptidos y algún inhibidor conocido de los receptores utilizados. En este caso no se pudo comprobar debido a que es necesario parametrizar los enlaces de los inhibidores porque en su mayoría son moléculas orgánicas que no son reconocidas por los campos de fuerza generales. Finalmente, es necesario para poder obtener mejores resultados en la experimentación *in vitro* es necesario que los péptidos sean purificados por métodos analíticos y que tengan una pureza al menos mayor al 80%.

Referencias:

1. Wei L, Zhou C, Su R, Zou Q, Hancock J. PEPred-Suite: Improved and robust prediction of therapeutic peptides using adaptive feature representation learning. *Bioinformatics*. 2019;35: 4272–4280. doi:10.1093/bioinformatics/btz246
2. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic Med Chem*. 2018;26: 2700–2707. doi:10.1016/j.bmc.2017.06.052
3. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. 1922. *Indian J Med Res*. 2007;125: 141–146. doi:10.2337/diab.5.1.69
4. Elkinton JR, Hunt AD, Godfrey L, Mccrory WW, Rogerson AG, Stokes J. Effects of pituitary adrenocorticotrophic hormone (acth) therapy. *J Am Med Assoc*. 1949;141: 1273–1279. doi:10.1001/jama.1949.02910180001001
5. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016. p. 194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
6. RJ D. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : I. PREPARATION OF THE AGENT. ITS ACTIVITY IN VITRO. *J Exp Med*. 1939;70: 1–10. doi:10.1084/JEM.70.1.1
7. RJ D. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : II. PROTECTIVE EFFECT OF THE BACTERICIDAL AGENT AGAINST EXPERIMENTAL PNEUMOCOCCUS INFECTIONS IN MICE. *J Exp Med*. 1939;70: 11–18. doi:10.1084/JEM.70.1.11
8. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020;0: 2559. doi:10.3389/FMICB.2020.582779

9. J S, RL G. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122: 261–266. doi:10.1016/J.JACI.2008.03.027
10. M Z. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002;415: 389–395. doi:10.1038/415389A
11. Y M, C L, X L, J W, H Y, Y W, et al. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics.* 2010;95: 66–71. doi:10.1016/J.YGENO.2009.09.004
12. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* Elsevier; 2009. pp. 1556–1563. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.018
13. Ladram A, Nicolas P. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. *Front Biosci - Landmark.* 2016;21: 1341–1371. doi:10.2741/4461
14. Wang G. Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length-dependent correlations for peptide design and prediction. *Antibiotics.* 2020;9: 1–26. doi:10.3390/antibiotics9080491
15. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11: 3919. Available: /pmc/articles/PMC6684887/
16. A S, S V, I I, GN T. Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2008;90: 83–93. doi:10.1002/BIP.20970
17. Benfield AH, Henriques ST. Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms. *Front Med Technol.* 2020;0: 20. doi:10.3389/FMEDT.2020.610997
18. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55: 27–55. doi:10.1124/PR.55.1.2

19. Hancock R, biotechnology HS-N, 2006 undefined. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *nature.com*. 2006;24. doi:10.1038/nbt1267
20. KA B. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005;3: 238–250. doi:10.1038/NRMICRO1098
21. Y P, KS H. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol*. 2005;38: 507–516. doi:10.5483/BMBREP.2005.38.5.507
22. F M, S L, U L, S F, A G. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/414729
23. AT J. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med*. 2007;11: 670–684. doi:10.1111/J.1582-4934.2007.00062.X
24. Le C-F, Fang C-M, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61. doi:10.1128/AAC.02340-16
25. CB P, KS Y, K M, MS K, SC K. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 8245–8250. doi:10.1073/PNAS.150518097
26. CB P, HS K, SC K. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244: 253–257. doi:10.1006/BBRC.1998.8159
27. D S, GD K, VJ S. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*. 1996;240: 532–539. doi:10.1111/J.1432-1033.1996.0532H.X

28. RF T, GD O, T X, JC V, FG O. Structural relationship between human salivary histatins. *J Dent Res.* 1990;69: 2–6. doi:10.1177/00220345900690010101
29. J L. Regulation of cell division in *E. coli*. *Trends Genet.* 1990;6: 22–25. doi:10.1016/0168-9525(90)90045-8
30. SS U, G B, JS S, S S, S K, P K, et al. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLoS One.* 2017;12. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0181748
31. CH C, TK L. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiot* (Basel, Switzerland). 2020;9. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9010024
32. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *N Engl J Med.* 2009;360: 439–443. doi:10.1056/NEJMP0804651
33. Santajit S, international NI-B research, 2016 undefined. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *hindawi.com*. [cited 27 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2475067/>
34. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance.* Dove Medical Press Ltd.; 2018. pp. 1645–1658. doi:10.2147/IDR.S173867
35. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol.* 2007;2: 1–33. doi:10.2478/S11535-007-0010-5/PDF
36. Basith S, Cui M, Macalino SJY, Choi S. Expediting the Design, Discovery and Development of Anticancer Drugs using Computational Approaches. *Curr Med Chem.* 2017;24. doi:10.2174/0929867323666160902160535
37. Xie M, Liu D, Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biol.* 2020;10: 200004. doi:10.1098/RSOB.200004

38. Pan X, Xu J, research XJ-C management and, 2020 undefined. Research progress evaluating the function and mechanism of anti-tumor peptides. ncbi.nlm.nih.gov. [cited 27 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc6970611/>
39. Hilchie AL, Hoskin DW, Power Coombs MR. Anticancer activities of natural and synthetic peptides. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1117: 131–147. doi:10.1007/978-981-13-3588-4_9
40. Y K. Computational approaches to therapeutic peptide discovery. *Biopolymers.* 2010;94: 701–710. doi:10.1002/BIP.21458
41. Farhadi T, Hashemian SM. Computer-aided design of amino acid-based therapeutics: a review. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12: 1239. doi:10.2147/DDDT.S159767
42. Zhou P, Wang C, Ren Y, Yang C, Tian F. Computational Peptidology: A New and Promising Approach to Therapeutic Peptide Design.
43. Ren Y, Tian F, Chemistry PZ-P in, 2012 undefined. Computational peptidology. manu56.magtech.com.cn. 2012 [cited 24 Aug 2021]. Available: <https://sci-hub.do/http://manu56.magtech.com.cn/progchem/EN/abstract/abstract10947.shtml>
44. G L, A S, B T, A K, D K. Peptidology: short amino acid modules in cell biology and immunology. *Amino Acids.* 2007;33: 703–707. doi:10.1007/S00726-006-0458-Z
45. K H, J D, S M, DA D. Interrogating the druggable genome with structural informatics. *Mol Divers.* 2006;10: 273–281. doi:10.1007/S11030-006-9035-3
46. J W, DC F, Z P, J R. Druggability assessment of protein-protein interfaces. *Future Med Chem.* 2011;3: 2021–2038. doi:10.4155/FMC.11.156
47. Zhou P, Wang C, Ren Y, Yang C, Tian F. Computational Peptidology: A New and Promising Approach to Therapeutic Peptide Design. *Curr Med Chem.* 2013;20: 1985–1996. doi:10.2174/0929867311320150005

48. MR A, A W. The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13: 284–290. doi:10.1016/J.CBPA.2009.05.125
49. A L, G P. Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy. *J Cell Physiol.* 2005;204: 750–762. doi:10.1002/JCP.20356
50. TL N, CJ M, JK H, J W, MW P. Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges. *Nat Rev Cancer.* 2014;14: 248–262. doi:10.1038/NRC3690
51. Lu H, Zhou Q, He J, Jiang Z, Peng C, Tong R, et al. Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 2020 51. 2020;5: 1–23. doi:10.1038/s41392-020-00315-3
52. GC K, P P, B A, H H, SE O. Analyzing protein-protein interaction networks. *J Proteome Res.* 2012;11: 2014–2031. doi:10.1021/PR201211W
53. K V, JF R, A V, U S, I L, T H-K, et al. An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat Methods.* 2009;6: 83–90. doi:10.1038/NMETH.1280
54. Di Leva FS, Tomassi S, Di Maro S, Reichart F, Notni J, Dangi A, et al. From a Helix to a Small Cycle: Metadynamics-Inspired $\alpha\beta6$ Integrin Selective Ligands. *Angew Chemie Int Ed.* 2018;57: 14645–14649. doi:10.1002/ANIE.201803250
55. Marino D Di, D’Annessa I, Tancredi H, Bagni C, Gallicchio E. A unique binding mode of the eukaryotic translation initiation factor 4E for guiding the design of novel peptide inhibitors. *Protein Sci.* 2015;24: 1370–1382. doi:10.1002/PRO.2708
56. M J, R J, SC D, PP M. A use of homology modeling and molecular docking methods: to explore binding mechanisms of nonylphenol and bisphenol A with antioxidant enzymes. *Methods Mol Biol.* 2015;1268: 273–289. doi:10.1007/978-1-4939-2285-7_12
57. Prieto-Martínez FD, Arciniega M, Medina-Franco JL, Prieto-Martínez FD, Arciniega M, Medina-Franco JL. Molecular docking: current advances and challenges. *TIP Rev*

Espec en ciencias químico-biológicas. 2018;21: 65–87.
doi:10.22201/FESZ.23958723E.2018.0.143

58. Vakser IA. Protein-Protein Docking: From Interaction to Interactome. *Biophys J*. 2014;107: 1785. doi:10.1016/J.BPJ.2014.08.033
59. Pincus MR, Scheraga HA. Conformational Energy Calculations of Enzyme-Substrate and Enzyme-Inhibitor Complexes of Lysozyme. 2. Calculation of the Structures of Complexes with a Flexible Enzyme. *Macromolecules*. 1979;12: 633–644. doi:10.1021/MA60070A016
60. MR P, SS Z, HA S. Prediction of three-dimensional structures of enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73: 4261–4265. doi:10.1073/PNAS.73.12.4261
61. KE P, FA M, HA S. Conformational energy calculations of enzyme-substrate interactions. II. Computation of the binding energy for substrates in the active site of -chymotrypsin. *Int J Pept Protein Res*. 1972;4: 201–219. doi:10.1111/J.1399-3011.1972.TB03420.X
62. Ciemny M, Kurcinski M, Kamel K, Kolinski A, Alam N, Schueler-Furman O, et al. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discov Today*. 2018;23: 1530–1537. doi:10.1016/J.DRUDIS.2018.05.006
63. Lee H, Heo L, Lee MS, Seok C. GalaxyPepDock: a protein–peptide docking tool based on interaction similarity and energy optimization. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: W431. doi:10.1093/NAR/GKV495
64. Raveh B, London N, Zimmerman L, Schueler-Furman O. Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors. *PLoS One*. 2011;6: e18934. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0018934
65. Cyril Dominguez, Rolf Boelens and, Bonvin* AMJJ. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J Am Chem Soc*. 2003;125: 1731–1737. doi:10.1021/JA026939X

66. X X, C Y, X Z. MDockPeP: An ab-initio protein-peptide docking server. *J Comput Chem.* 2018;39: 2409–2413. doi:10.1002/JCC.25555
67. Kurcinski M, Jamroz M, Blaszczyk M, Kolinski A, Kmiecik S. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: W419. doi:10.1093/NAR/GKV456
68. Alam N, Goldstein O, Xia B, Porter KA, Kozakov D, Schueler-Furman O. High-resolution global peptide-protein docking using fragments-based PIPER-FlexPepDock. *PLOS Comput Biol.* 2017;13: e1005905. doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1005905
69. KA P, B X, D B, T B, N A, O S-F, et al. ClusPro PeptiDock: efficient global docking of peptide recognition motifs using FFT. *Bioinformatics.* 2017;33: 3299–3301. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTX216
70. Lensink MF, Velankar S, Wodak SJ. Modeling protein–protein and protein–peptide complexes: CAPRI 6th edition. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2017;85: 359–377. doi:10.1002/PROT.25215
71. Kundrotas P, Zhu Z, ... JJ-P of the, 2012 undefined. Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins. *Natl Acad Sci.* [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://www.pnas.org/content/109/24/9438.short>
72. AW G, MD D, M S-T, DW R. Protein docking using case-based reasoning. *Proteins.* 2013;81: 2150–2158. doi:10.1002/PROT.24433
73. S M, Y Z. Protein-protein complex structure predictions by multimeric threading and template recombination. *Structure.* 2011;19: 955–966. doi:10.1016/J.STR.2011.04.006
74. L L, H L, J S. MULTIPROSPECTOR: an algorithm for the prediction of protein-protein interactions by multimeric threading. *Proteins.* 2002;49: 350–364. doi:10.1002/PROT.10222

75. A S, TL B. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234: 779–815. doi:10.1006/JMBI.1993.1626
76. Kuzu G, Gursoy A, Nussinov R, Keskin O. Exploiting conformational ensembles in modeling protein-protein interactions on the proteome scale. *J Proteome Res.* 2013;12: 2641. doi:10.1021/PR400006K
77. AS A, A G, O K. Prediction of protein-protein interactions by combining structure and sequence conservation in protein interfaces. *Bioinformatics.* 2005;21: 2850–2855. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTI443
78. Donsky E, Wolfson HJ. PepCrawler: a fast RRT-based algorithm for high-resolution refinement and binding affinity estimation of peptide inhibitors. *Bioinformatics.* 2011;27: 2836–2842. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTR498
79. I A. DynaDock: A new molecular dynamics-based algorithm for protein-peptide docking including receptor flexibility. *Proteins.* 2010;78: 1084–1104. doi:10.1002/PROT.22629
80. Jain AN. Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem.* 2003;46: 499–511. doi:10.1021/JM020406H
81. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins Struct Funct Genet.* 2003;52: 609–623. doi:10.1002/PROT.10465
82. Rentzsch R, *Bioinformatics BR-B in, 2015 undefined.* Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using AutoDock Vina. *academic.oup.com.* [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://academic.oup.com/bib/article-abstract/16/6/1045/225862>
83. Yan C, Xu X, *Structure XZ-, 2016 undefined.* Fully blind docking at the atomic level for protein-peptide complex structure prediction. *Elsevier.* [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci->

hub.do/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212616302404

84. Vries S de, Rey J, ... CS-N acids, 2017 undefined. The pepATTRACT web server for blind, large-scale peptide–protein docking. academic.oup.com. [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://academic.oup.com/nar/article-abstract/45/W1/W361/3782603>
85. Ben-Shimon A, Structure MN-, 2015 undefined. AnchorDock: blind and flexible anchor-driven peptide docking. Elsevier. [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096921261500088X>
86. Blaszczyk M, Ciemny M, ... AK-B in, 2019 undefined. Protein–peptide docking using CABS-dock and contact information. academic.oup.com. [cited 28 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://academic.oup.com/bib/article-abstract/20/6/2299/5095729>
87. Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinforma.* 2016;2016: 5.6.1-5.6.37. doi:10.1002/CPBI.3
88. Blaszczyk M, Kurcinski M, Kouza M, Wieteska L, Debinski A, Kolinski A, et al. Modeling of protein–peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. *Methods.* 2016;93: 72–83. doi:10.1016/J.YMETH.2015.07.004
89. Hollingsworth SA, Dror RO. Review Molecular Dynamics Simulation for All. 2018 [cited 28 Jul 2021]. doi:10.1016/j.neuron.2018.08.011
90. M K, JA M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* 2002;9: 646–652. doi:10.1038/NSB0902-646
91. Alder BJ, Wainwright TE. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J Chem Phys.* 2004;27: 1208. doi:10.1063/1.1743957
92. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. Dynamics of folded proteins. *Nat* 1977 2675612. 1977;267: 585–590. doi:10.1038/267585a0

93. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpi JL. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinforma Chem.* 2015;8: 37–47. doi:10.2147/AABC.S70333
94. K K. Molecular modeling of peptides. *Methods Mol Biol.* 2015;1268: 15–41. doi:10.1007/978-1-4939-2285-7_2
95. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1998;79: 926. doi:10.1063/1.445869
96. Berendsen HJC, Postma JPM, Gunsteren WF van, Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. 1981; 331–342. doi:10.1007/978-94-015-7658-1_21
97. Anandakrishnan R, Drozdetski A, Walker RC, Onufriev AV. Speed of Conformational Change: Comparing Explicit and Implicit Solvent Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J.* 2015;108: 1153. doi:10.1016/J.BPJ.2014.12.047
98. Jr. ADM, Wiorkiewicz-Kuczera J, Karplus M. An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic acids. *J Am Chem Soc.* 2002;117: 11946–11975. doi:10.1021/JA00153A017
99. Cacelli I, Lami CF, Prampolini G. Force-field modeling through quantum mechanical calculations: Molecular dynamics simulations of a nematogenic molecule in its condensed phases. *J Comput Chem.* 2009;30: 366–378. doi:10.1002/JCC.21062
100. Pérez A, Lankas F, Luque FJ, Orozco M. Towards a molecular dynamics consensus view of B-DNA flexibility. *Nucleic Acids Res.* 2008;36: 2379. doi:10.1093/NAR/GKN082
101. M R, C F-C, T M, A P, J C, A H, et al. A consensus view of protein dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 796–801. doi:10.1073/PNAS.0605534104
102. Dawe G, Musgaard M, Aourousseau M, Neuron NN-, 2016 undefined. Distinct

structural pathways coordinate the activation of AMPA receptor-auxiliary subunit complexes. Elsevier. [cited 30 Jul 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627316000635>

103. Delemotte L, Tarek M, ... MK-P of the, 2011 undefined. Intermediate states of the Kv1. 2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Natl Acad Sci.* 2011;108: 6109–6114. doi:10.1073/pnas.1102724108/-/DCSupplemental
104. Lazim R, Suh D, Choi S. Advances in Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling Methods for the Study of Protein Systems. *Int J Mol Sci.* 2020;21: 1–20. doi:10.3390/IJMS21176339
105. D'Annessa I, Leva FS Di, Teana A La, Novellino E, Limongelli V, Marino D Di. Bioinformatics and Biosimulations as Toolbox for Peptides and Peptidomimetics Design: Where Are We? *Front Mol Biosci.* 2020;7. doi:10.3389/FMOLB.2020.00066
106. Shan Y, Kim ET, Eastwood MP, Dror RO, Seeliger MA, Shaw DE. How does a drug molecule find its target binding site? *J Am Chem Soc.* 2011;133: 9181–9183. doi:10.1021/JA202726Y
107. Dror R, Pan A, ... DA-P of the, 2011 undefined. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Natl Acad Sci.* [cited 31 Jul 2021]. doi:10.1073/pnas.1104614108/-/DCSupplemental
108. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10: 449. doi:10.1517/17460441.2015.1032936
109. CASE DA, CHEATHAM TE, III, DARDEN T, GOHLKE H, LUO R, et al. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J Comput Chem.* 2005;26: 1668. doi:10.1002/JCC.20290
110. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015;1–2: 19–25. doi:10.1016/J.SOFTX.2015.06.001

111. Kumari R, Kumar R, Consortium OSDD, Lynn A. g_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J Chem Inf Model*. 2014;54: 1951–1962. doi:10.1021/CI500020M
112. Bill R. Miller I, T. Dwight McGee J, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J Chem Theory Comput*. 2012;8: 3314–3321. doi:10.1021/CT300418H
113. Hwang TJ, Carpenter D, Lauffenburger JC, Wang B, Franklin JM, Kesselheim AS. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. *JAMA Intern Med*. 2016;176: 1826–1833. doi:10.1001/JAMAINTERNMED.2016.6008
114. Lombardino JG, Lowe JA. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. *Nat Rev Drug Discov* 2004 310. 2004;3: 853–862. doi:10.1038/nrd1523
115. Bruno BJ, Miller GD, Lim CS. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2013. pp. 1443–1467. doi:10.4155/tde.13.104
116. Weng G, Wang E, Chen F, Sun H, Wang Z, Hou T. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 9. Prediction reliability of binding affinities and binding poses for protein–peptide complexes. *Phys Chem Chem Phys*. 2019;21: 10135–10145. doi:10.1039/C9CP01674K
117. Proaño Bolaños C del C. Unravelling skin secretion peptidomes of *Cruziophyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* and *Hypsiboas picturatus* (HYLIDAE). 2016.
118. O K, H BM, R E-M, R K. RK1, the first very short peptide from *Buthus occitanus tunetanus* inhibits tumor cell migration, proliferation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;499: 1–7. doi:10.1016/J.BBRC.2018.01.133
119. 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, *Cruziophyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016;146: 1–13. doi:10.1016/J.JPROT.2016.06.017

120. Tsimberidou A-M. TARGETED THERAPY IN CANCER. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76: 1113. doi:10.1007/S00280-015-2861-1
121. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquinga F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C, et al. Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog *Agalychnis spurrelli*. *J Mol Model*. 2019;25. doi:10.1007/s00894-019-4141-1
122. Protein Structure | Learn Science at Scitable. [cited 2 Oct 2021]. Available: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/protein-structure-14122136/>
123. Ramirez UD, Myachina F, Stith L, Jaffe EK. Docking to large allosteric binding sites on protein surfaces. *Adv Exp Med Biol*. 2010;680: 481. doi:10.1007/978-1-4419-5913-3_54
124. Rentzsch R, Bioinformatics BR-B in, 2015 undefined. Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using AutoDock Vina. *academic.oup.com*. [cited 10 Aug 2021]. Available: <https://sci-hub.do/https://academic.oup.com/bib/article-abstract/16/6/1045/225862>
125. Hauser AS, Windshügel B. LEADS-PEP: A Benchmark Data Set for Assessment of Peptide Docking Performance. *J Chem Inf Model*. 2016;56: 188–200. doi:10.1021/ACS.JCIM.5B00234
126. LH O, A R-A, LI L, C C-L, M K, E L, et al. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 16808–16813. doi:10.1073/PNAS.1300118110
127. Sargsyan K, Grauffel C, Lim C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput*. 2017;13: 1518–1524. doi:10.1021/ACS.JCTC.7B00028
128. Casoni A, Clerici F, Contini A. Molecular dynamic simulation of mGluR5 amino terminal domain: essential dynamics analysis captures the agonist or antagonist behaviour of ligands. *J Mol Graph Model*. 2013;41: 72–78. doi:10.1016/j.jmgm.2013.02.002

129. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10: 449. doi:10.1517/17460441.2015.1032936
130. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol.* 2013;4. doi:10.3389/FMICB.2013.00294
131. JM O, U P, ML S, JA W, KM S. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature.* 2013;503: 548–551. doi:10.1038/NATURE12796
132. M S, L T, J W, Y L, NS G, S K, et al. Catalytic Domain Plasticity of MKK7 Reveals Structural Mechanisms of Allosteric Activation and Diverse Targeting Opportunities. *Cell Chem Biol.* 2020;27: 1285-1295.e4. doi:10.1016/J.CHEMBIOL.2020.07.014
133. Li J, Koh J-J, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci.* 2017;0: 73. doi:10.3389/FNINS.2017.00073

Anexos:

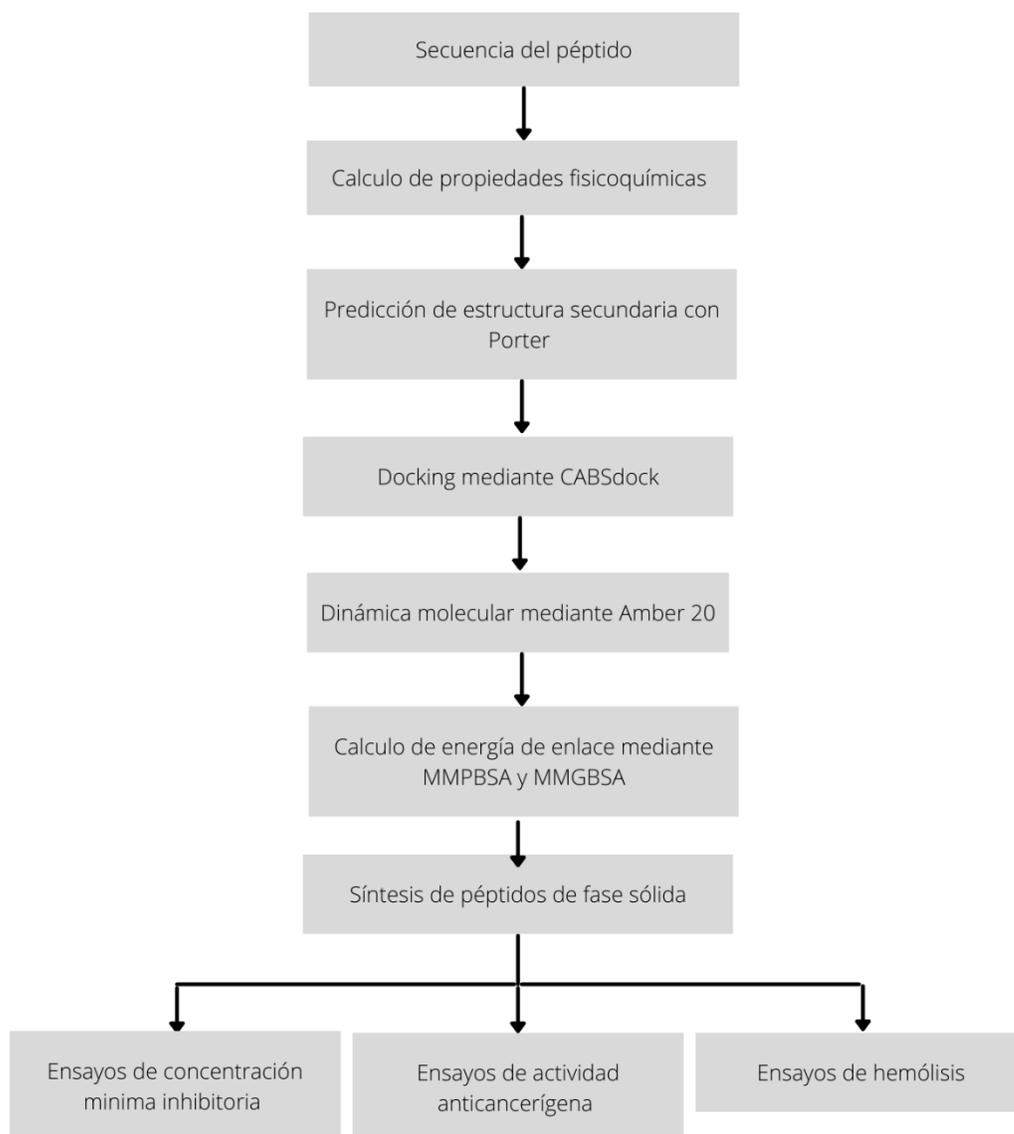


Figura A1. Resumen de metodología *in silico* e *in vitro* utilizada. Los programas utilizados para acoplamiento y dinámica molecular fueron de dominio público.

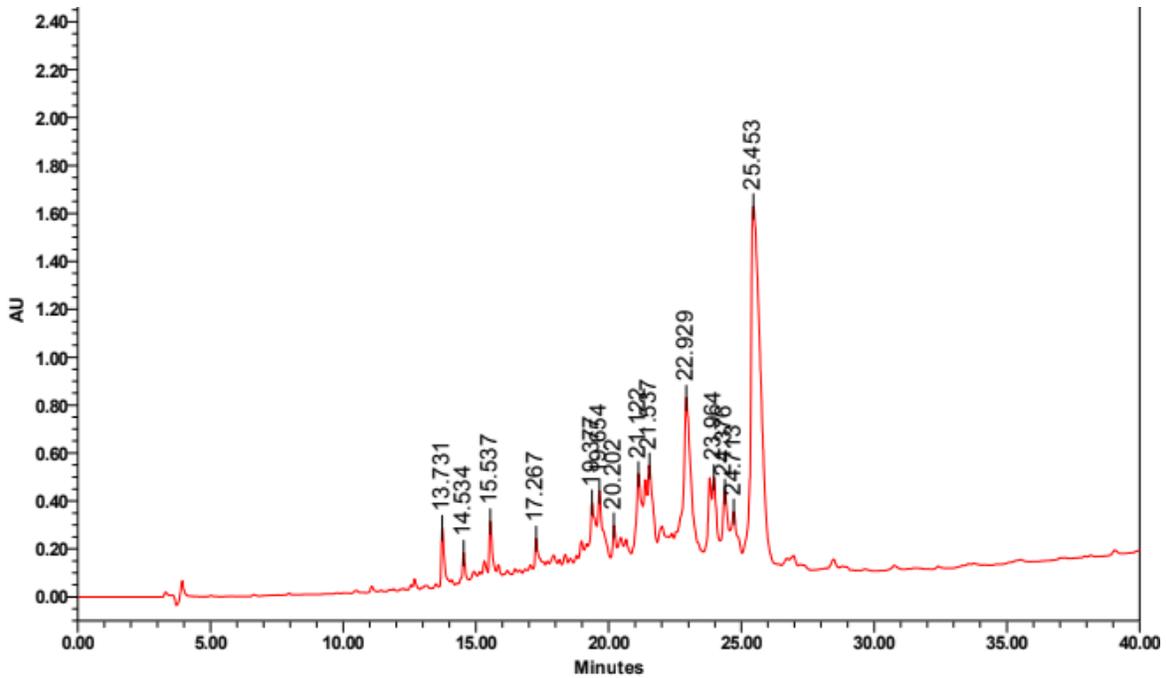


Figura A2 Cromatograma de purificación del péptido sintético mediante RP-HPLC. El tiempo de retención del péptido AS1 fue de 25.45 minutos y pureza 49.02%.

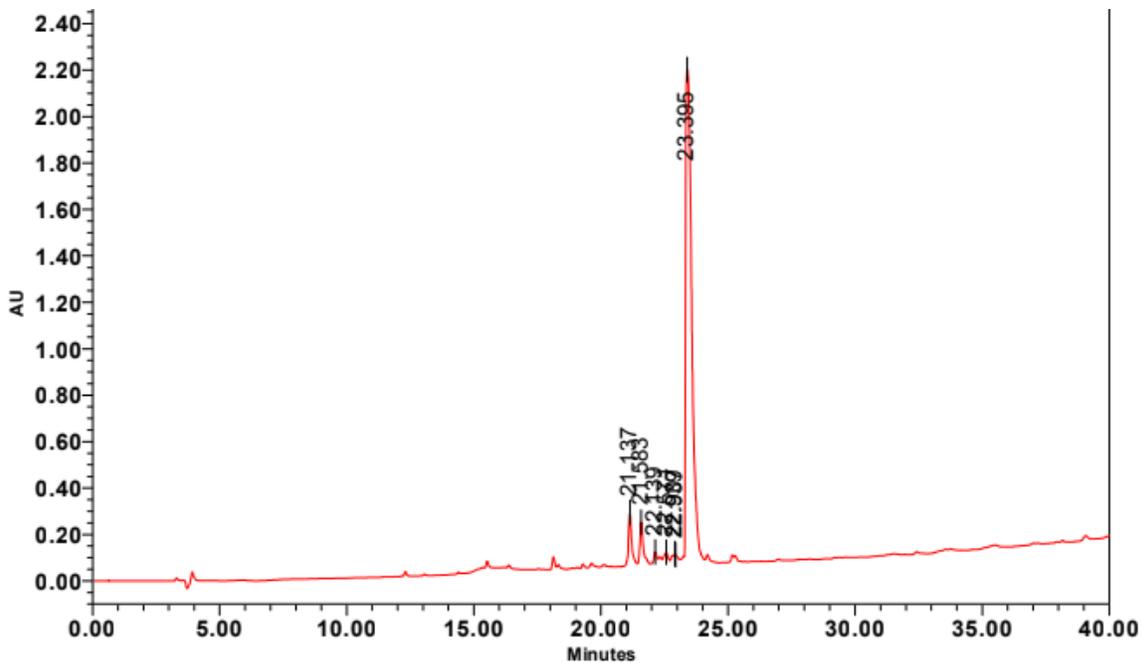


Figura A3 Cromatograma de purificación del péptido sintético mediante RP-HPLC. El tiempo de retención del péptido CC3 fue de 23.395 y una pureza de 86.95%.

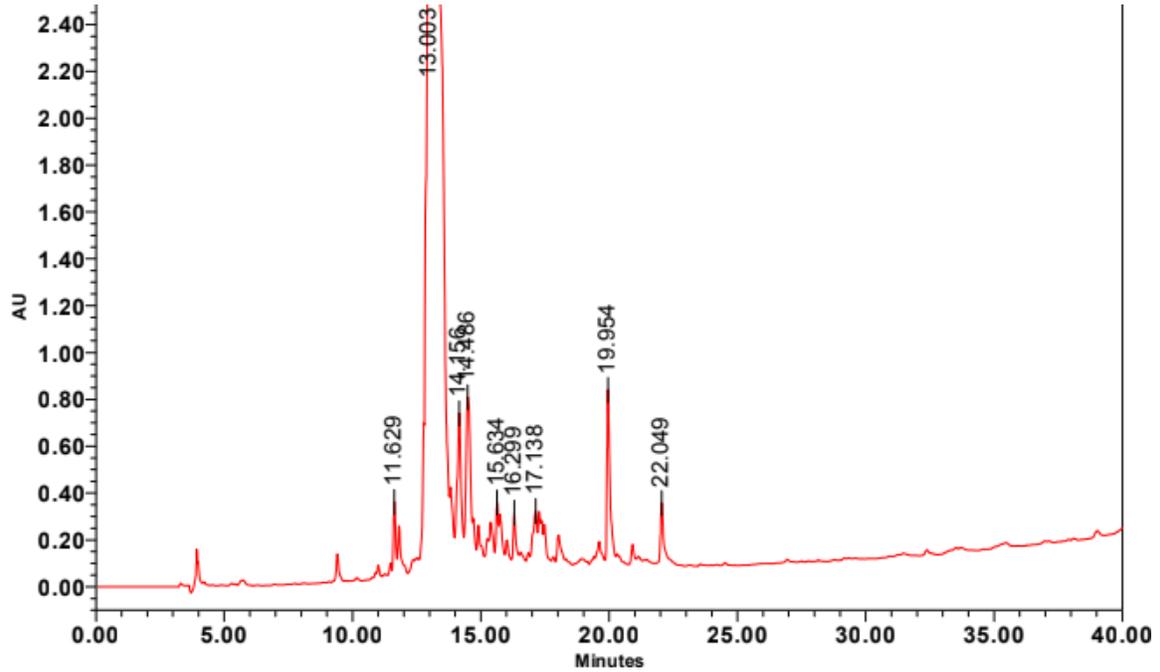


Figura A4. Cromatograma de purificación del péptido sintético CC4 mediante RP-HPLC. El tiempo de retención del péptido CC4 fue de 13.00 minutos y una pureza de 77.31%.

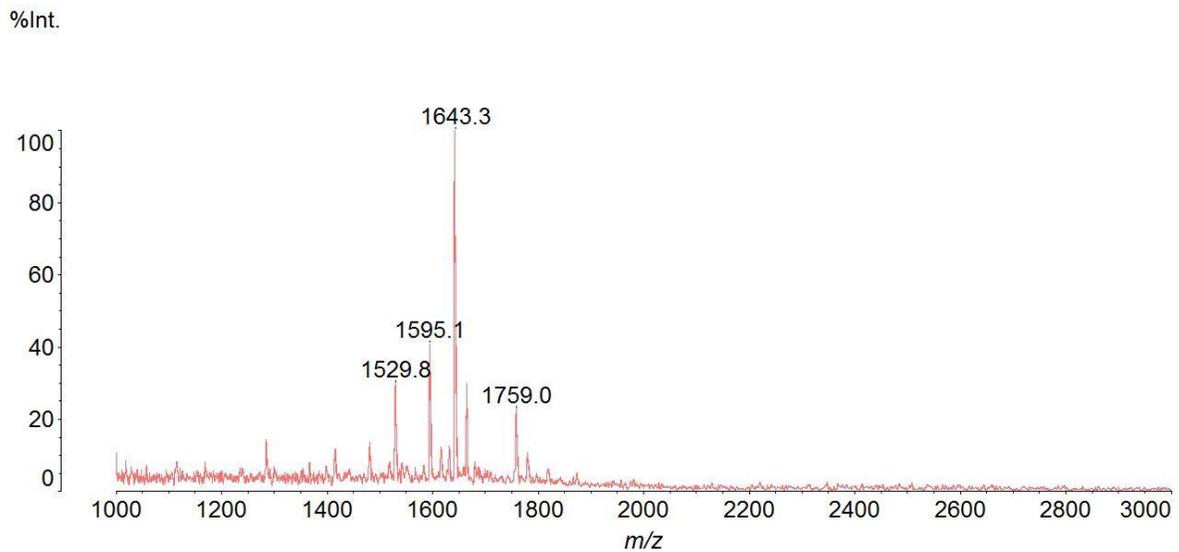


Figura A5. Espectro de masas del péptido sintético AS1. Presenta una $m/z = 1643.3$ Da.

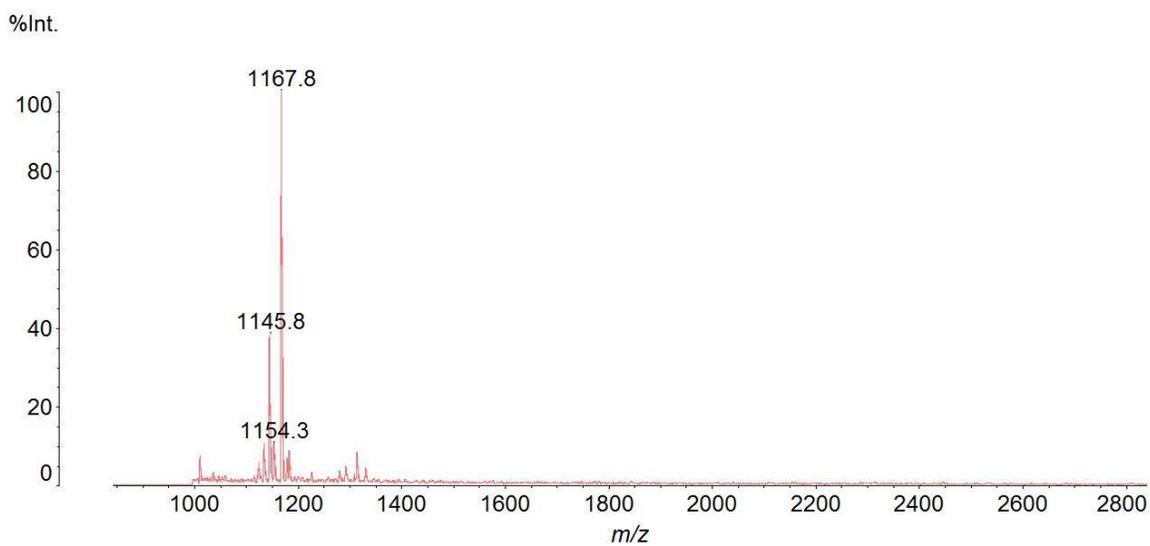


Figura A6. Espectro de masas del péptido sintético CC3. Presenta una $m/z = 1167.8$ Da.

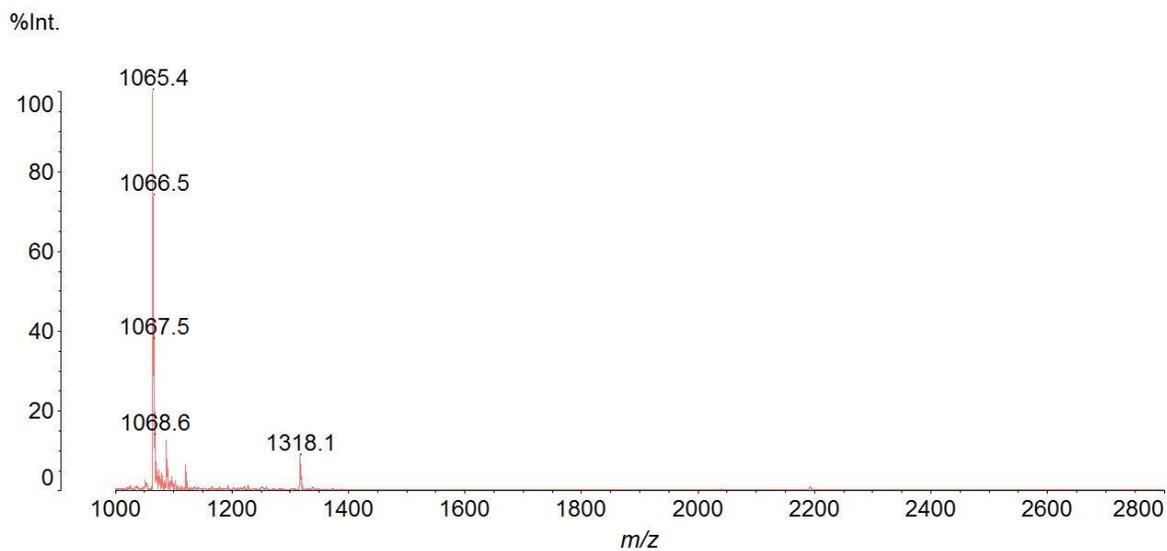


Figura A7. Espectro de masas del péptido sintético CC4. Presenta una $m/z = 1065.4$.

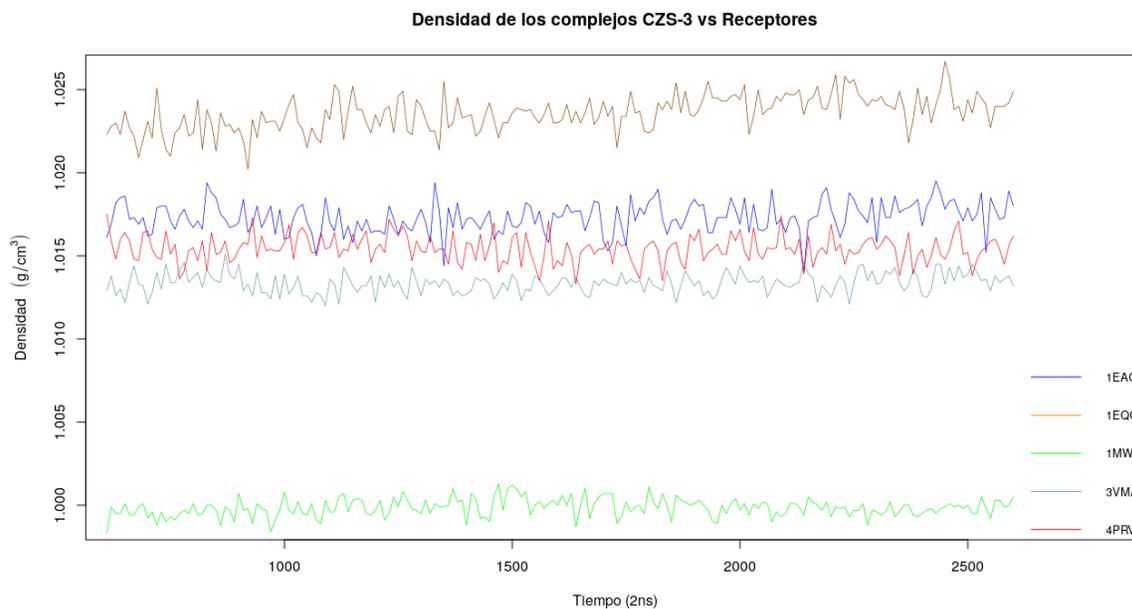


Figura A8. Parámetro densidad de los complejos del péptido CZS-3 contra los receptores bacterianos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

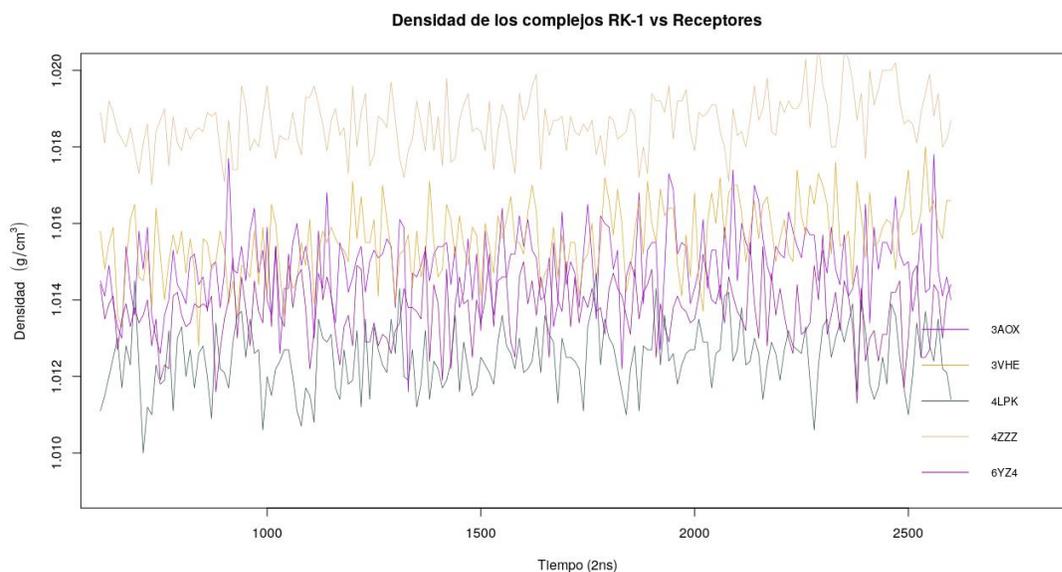


Figura A9. Parámetro densidad de los complejos del péptido RK-1 contra los receptores cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

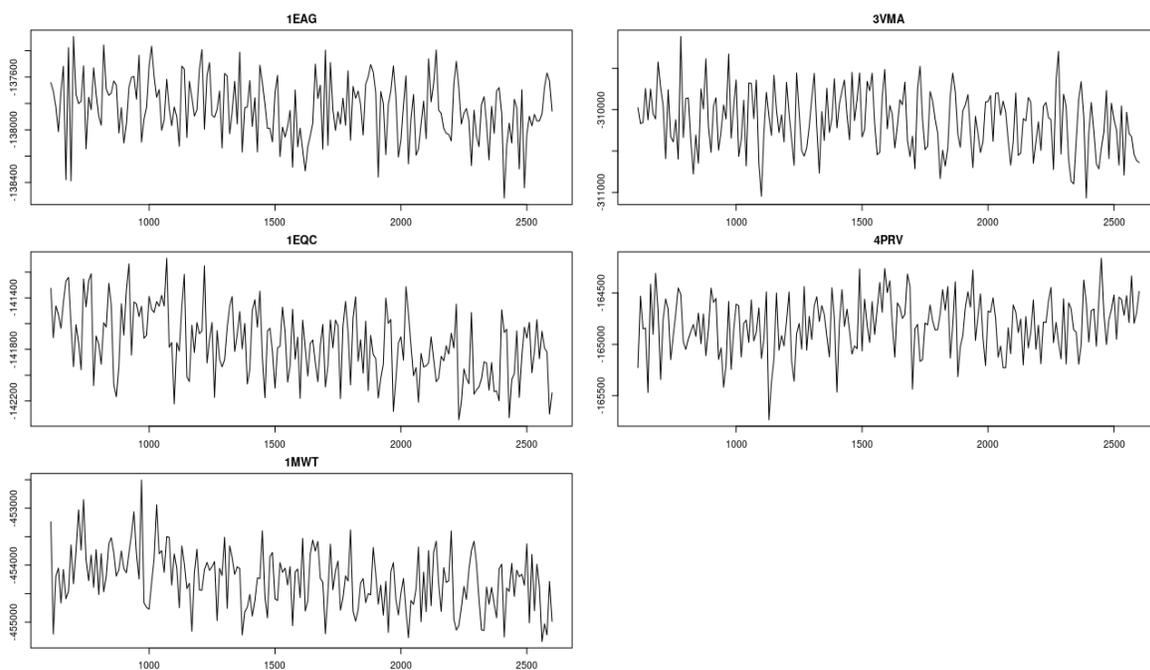


Figura A10. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido CZS-3 contra los receptores microbianos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

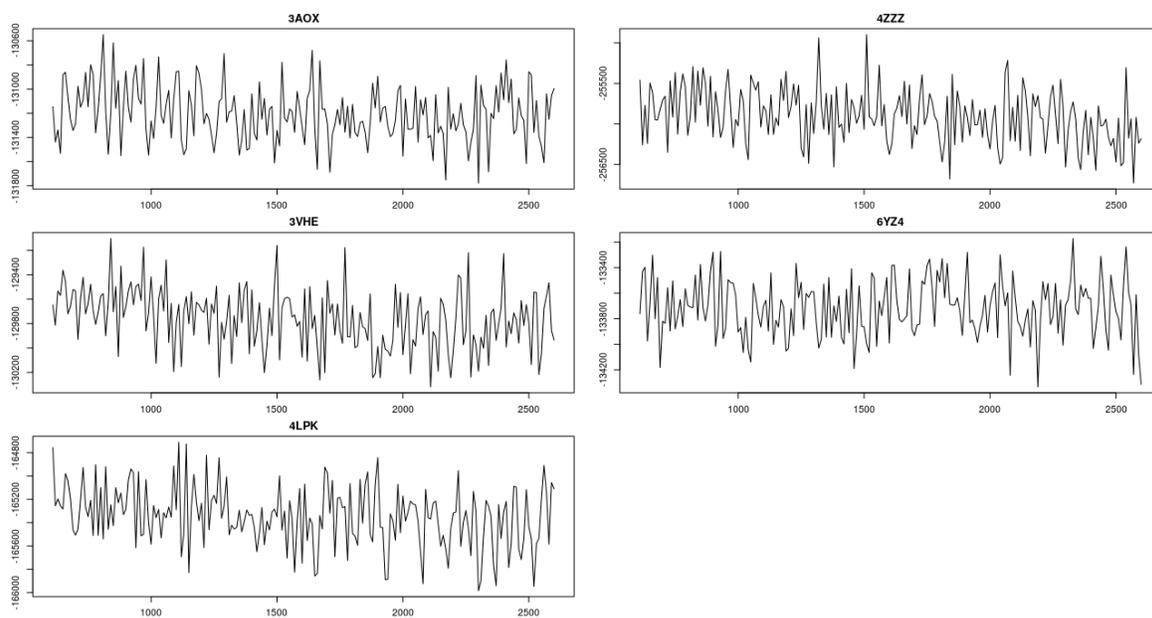


Figura A11. Parámetro de energía total (kcal/mol) del péptido RK-1 contra los receptores cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

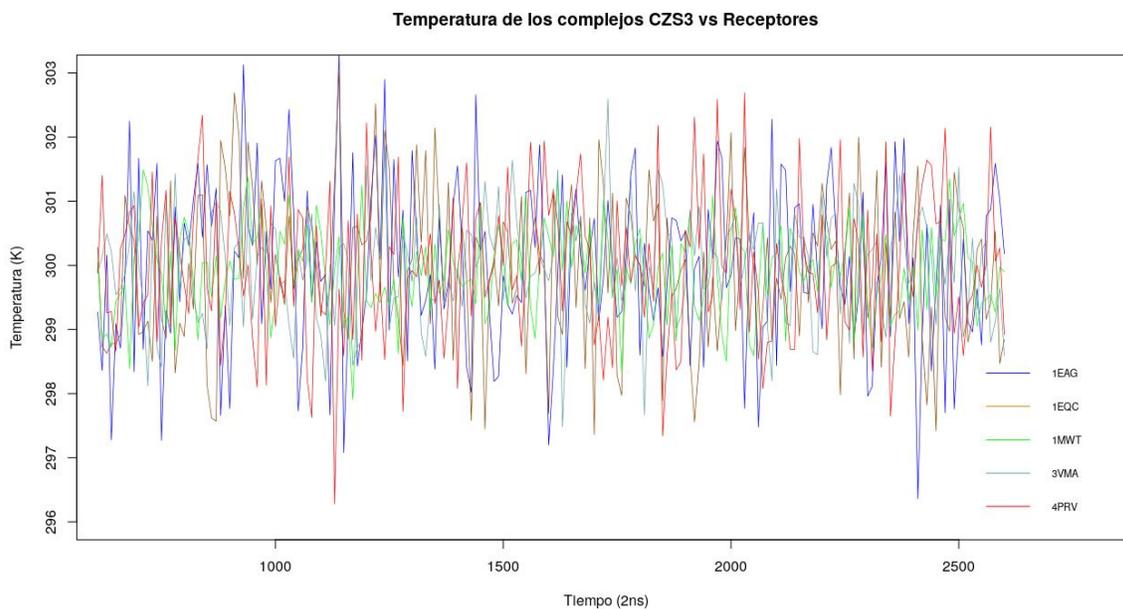


Figura A12. Parámetro de temperatura (K) del péptido CZS-3 contra los receptores microbianos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

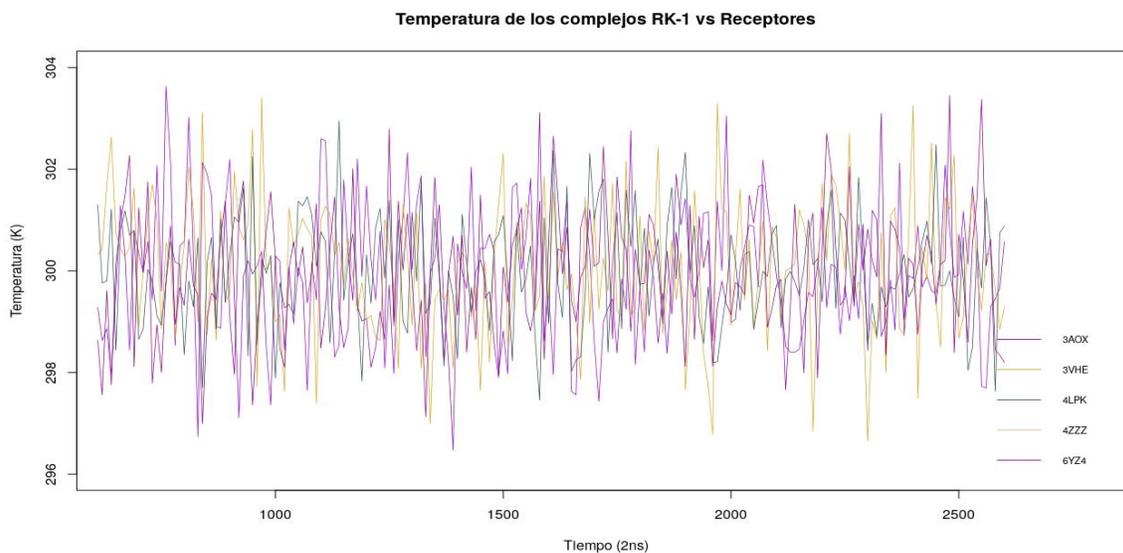


Figura A13. Parámetro de temperatura (K) del péptido CZS-3 contra los receptores microbianos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que en todos los complejos se alcanzó un punto de equilibrio.

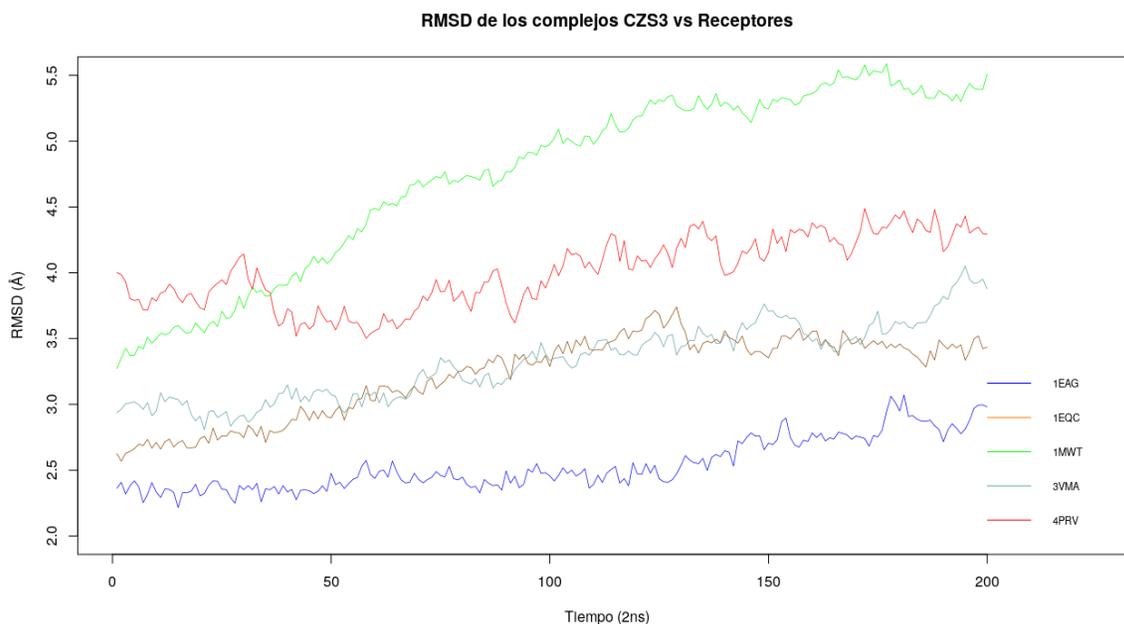


Figura A14. RMSD backbone (Å) del péptido CZS-3 contra los receptores microbianos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que los valores tendían a converger y alcanzar el equilibrio.

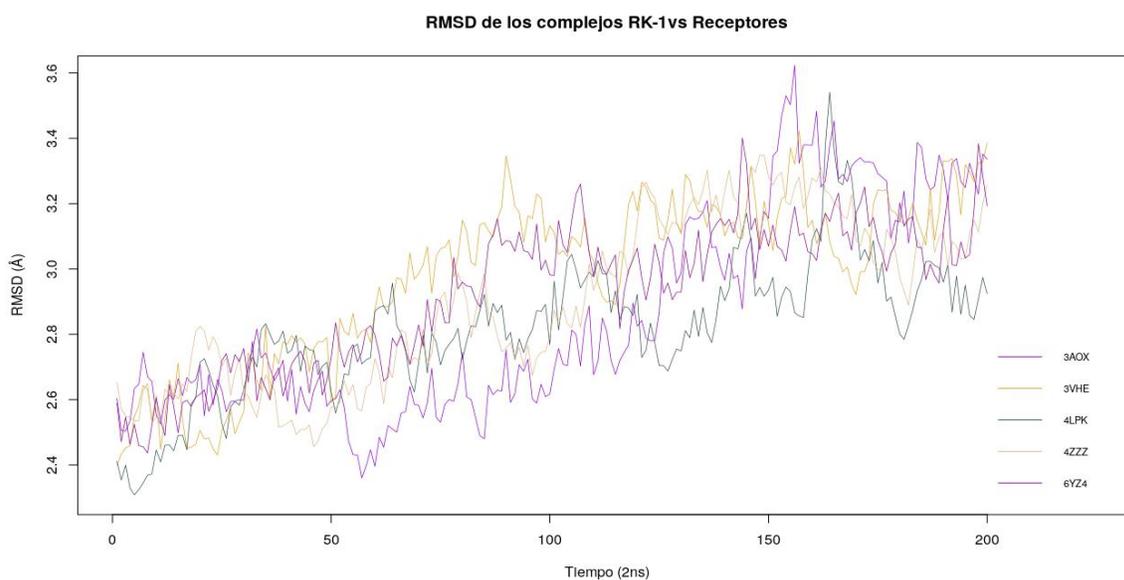


Figura A15. RMSD backbone (Å) del péptido RK-1 contra los receptores cancerígenos. Las simulaciones de interacción fueron realizadas durante 2ns y se observó que los valores tendían a converger y alcanzar el equilibrio.

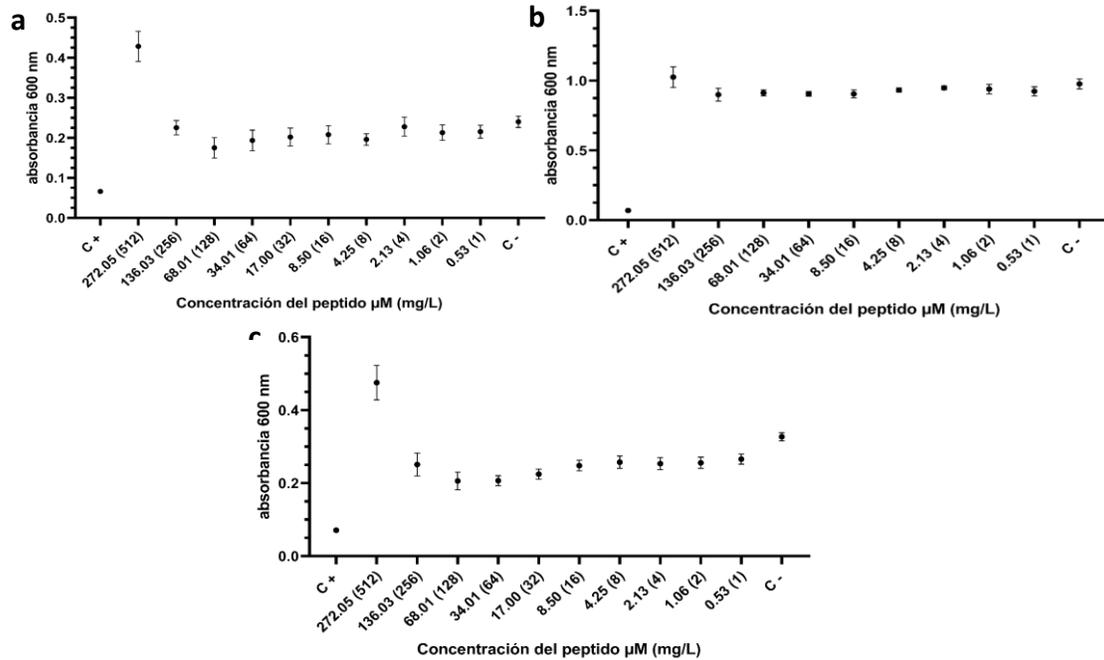


Figura A16. Concentración mínima inhibitoria del péptido sintético CC4 contra a. *C. albicans* b. *E. coli* y c. *S. aureus*. Los microorganismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de péptidos desde 1 a 512 mg/L. Los experimentos fueron realizados por triplicado

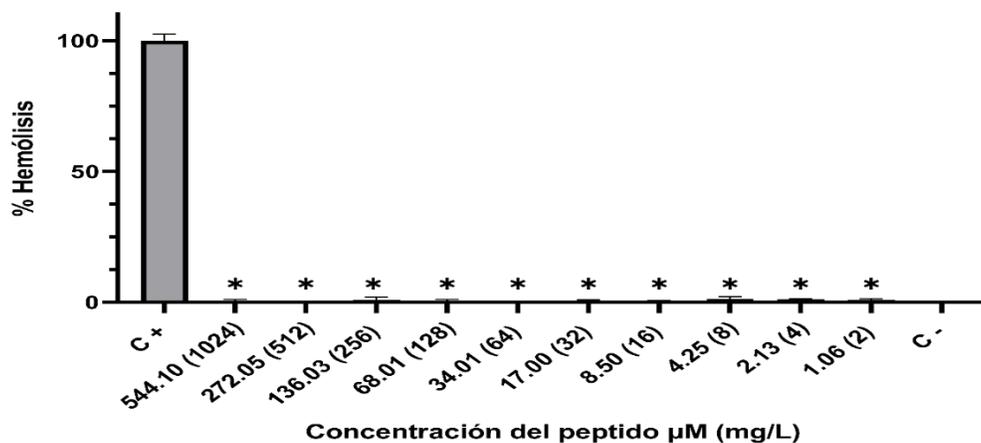


Figura A17. Porcentaje de hemólisis del péptido CC3. El péptido no superó el 3% de disrupción celular en las distintas concentraciones. El control positivo (Triton X-100) fue considerado como el 100% de hemólisis. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y prueba post hoc Tukey (* $p \leq 0.05$).