

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO DE NUEVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS EN EL
PÉPTIDO LINEATINA-2**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MARIANA ELIZABETH SILVA MORETA

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

TENA-ECUADOR

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 11 de marzo del 2025

De mi consideración:

Yo, Mariana Elizabeth Silva Moreta, con documento de identidad 1550056228, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería 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 el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

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

Atentamente,



Mariana Elizabeth Silva Moreta

CI: 1550056228

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Tena, 11 de marzo del 2025

Yo, Mariana Elizabeth Silva Moreta, con documento de identidad 1550056228 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Lineatina-2”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Atentamente,



Mariana Elizabeth Silva Moreta

CI: 1550056228

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Tena, 11 de marzo del 2025

Certifico que el trabajo de titulación: “Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Lineatina-2”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de tesis, fue realizado por Mariana Elizabeth Silva Moreta, 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.

Atentamente,

PhD. Carolina del Carmen Proaño Bolaños

CI:1714818760

AGRADECIMIENTO

Expreso mi profunda gratitud a la Universidad Regional Amazónica Ikiam por brindarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto, así como por facilitar el acceso a sus instalaciones y herramientas científicas, fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A mi directora de tesis, PhD. Carolina Proaño Bolaños, por su orientación, paciencia y apoyo a lo largo de este camino. Su conocimiento, dedicación y entusiasmo han sido clave en mi crecimiento académico y profesional, motivándome a superar desafíos y perfeccionar mi trabajo.

A PhD. Cristina Quiroga, por sus valiosas observaciones, sugerencias y aportes, los cuales enriquecieron significativamente este estudio y contribuyeron a su mejora.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme alcanzar este gran logro y ser mi guía en cada paso de este camino.

A mis padres y a mi hermano, por su amor incondicional, su apoyo inquebrantable y su sacrificio diario. Han sido el pilar fundamental que me ha sostenido en este desafiante recorrido, brindándome siempre fuerzas para seguir adelante.

A mi sobrino Inti, mi sol en este camino, cuya luz y alegría han sido una fuente constante de motivación.

A mí misma, por cada obstáculo superado, por cada miedo enfrentado, por no rendirme ante las dificultades y seguir adelante con determinación para alcanzar este anhelado sueño.

A Gerardo, Harold, Sonia y Rosita, por ser mi refugio y mi lugar seguro. Gracias por hacer este viaje más ligero, por alentarme a seguir mirando hacia adelante y por recordarme, en cada caída, que siempre hay razones para continuar. Su amor y apoyo incondicional han sido un impulso invaluable.

A mis amigos, en especial a Jairo, Romel, Dennis, Dominic, Jhimy y Anderson, por estar a mi lado en cada desafío académico, llenar de alegría cada momento y convertir este proceso en una experiencia inolvidable con su apoyo y motivación constante.

Finalmente, a toda mi familia, por sus constantes muestras de cariño, por creer en mí sin reservas y por ser una fuente de inspiración en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Péptidos antimicrobiano.....	1
1.1.1. Mecanismo de acción.....	1
1.1.2. AMPs en anuros.....	3
1.1.3. Limitaciones en los péptidos antimicrobianos.....	3
1.1.4. Diseño de análogos.....	4
1.1.4.1. Estrategias de modificación dirigida al sitio.....	4
1.1.4.2. Análogos con mayor cationicidad.....	5
1.1.4.3. Análogos con modulación de la hidrofobicidad.....	5
1.1.4.4. Análogos peptídicos CPPs.....	6
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
1.4. Objetivos de la Investigación.....	9

1.4.1.	Objetivo General.....	9
1.4.2.	Objetivos Específicos.....	9
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....		10
2.1.	Estrategias de diseño.....	10
2.1.1.	Estrategia 1: Ajuste de hidrofobicidad y aumento de cationicidad	10
2.1.1.1.	Fase 1: Modificación en cara polar y no polar.....	10
2.1.1.2.	Fase 2: Integración de modificaciones en ambas caras.....	11
2.1.2.	Estrategia 2: Diseño de análogos CPPs.....	11
2.2.	Proceso de cribado.....	12
2.2.1.	Cribado por actividad antibacteriana.....	12
2.2.2.	Cribado por actividad hemolítica.....	13
2.2.3.	Cribado por Helicidad.....	13
2.3.	Modelado estructural de los análogos prometedores.....	14
2.4	Acoplamiento Molecular.....	14
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		15
3.1.	Proceso algorítmico para la selección de análogos prometedores.....	15
3.2.	Estrategia 1: Ajuste de hidrofobicidad y aumento de cationicidad	16
3.2.1.	Fase 1: Modificación en cara polar y no polar.....	16
3.2.2.	Fase 2: Integración de modificaciones en ambas caras.	16
3.3.	Estrategia 2: Diseño de análogos CPP	16
3.4.	Análogos prometedores	17
3.5.	Modelamiento Estructural	20
3.6.	Acoplamiento molecular	22
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....		25
4.1.	Estrategias de diseño.....	25
4.2.	Evaluación <i>in silico</i> de péptidos.....	27

4.3.	Caracterización de análogos prometedores	28
4.4.	Acoplamiento molecular	33
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3: Algoritmo de selección de análogos prometedores	16
Figura 2-3: Predicción de la estructura de análogos prometedores.....	22
Figura 3-3: Interacción de los análogos peptídicos energética.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3: Secuencias de análogos prometedores.....	17
Tabla 2-3: Propiedades fisicoquímicas de los análogos prometedores.....	18
Tabla 3-3: Análogos con mayor penetración con la membrana.....	18
Tabla 4-3: Predicción de actividad de los análogos prometedores.....	19
Tabla 5-3: Predicción del potencial hemolítico de los análogos.....	19
Tabla 6-3: Variables considerables en alphafold.....	22
Tabla 7-3: Valores de mayor afinidad energética. Gram negativa.....	23
Tabla 8-3: Valores de mayor afinidad energética. Gram positiva.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Herramientas *in silico*

Anexo B: Análogos generados aumentando la cationicidad

Anexo C: Análogos generados por modulación de hidrofobicidad

Anexo D: Análogos generados al modificar ambas caras

Anexo E: Diseño de análogos CPP al modificar ambas caras

Anexo F: Valores de afinidad entre membranas y análogos

RESUMEN

El uso inadecuado de antibióticos ha incrementado significativamente la resistencia antimicrobiana a nivel mundial, lo que ha generado la necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. En este contexto, los péptidos antimicrobianos se presentan como una alternativa prometedora debido a su amplio espectro de actividad. Este trabajo de investigación se enfocó en el diseño de análogos peptídicos bioinspirados en el péptido Lineatina-2, con el objetivo de obtener compuestos con mayor actividad antimicrobiana y menor efecto hemolítico. Para ello, se desarrollaron librerías de análogos mediante dos estrategias: 1) ajuste de cationicidad e hidrofobicidad en distintas regiones del péptido y 2) sustitución de aminoácidos para favorecer su capacidad de penetración en la membrana (CPPs). El potencial antimicrobiano, la citotoxicidad, la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los análogos fueron evaluados utilizando herramientas *in silico*, filtrando aquellos con baja actividad antimicrobiana o elevado efecto hemolítico. Así mismo, se realizaron estudios de acoplamiento molecular entre los análogos y membranas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. Los análisis bioinformáticos revelaron que la mayoría de los análogos diseñados mostraron un bajo efecto hemolítico y una actividad antimicrobiana superior a la del péptido Lineatina-2. Además, los resultados de acoplamiento molecular sugieren que los análogos tienen mayor afinidad por las membranas de bacterias Gram positivas. Por lo tanto, la evaluación *in silico* realizada en este estudio, mediante estrategias de diseño racional, permitió generar análogos con un mayor potencial de actividad antimicrobiana y un bajo efecto hemolítico, destacando su viabilidad como candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

PALABRAS CLAVE: Péptidos antimicrobianos, lineatina-2, diseño racional, herramientas *in silico*, análogo.

ABSTRACT

The inappropriate use of antibiotics has significantly increased antimicrobial resistance worldwide, creating an urgent need to develop new antimicrobial agents. In this context, antimicrobial peptides have emerged as a promising alternative due to their broad spectrum of activity. This research focused on the design of peptide analogs inspired by the Lineatina-2 peptide, aiming to obtain compounds with enhanced antimicrobial activity and reduced hemolytic effect. To achieve this, libraries of analogs were developed using two strategies: 1) adjusting cationic and hydrophobicity in different regions of the peptide and 2) substituting amino acids to enhance their membrane penetration capacity (CPPs). The analogs' antimicrobial potential, cytotoxicity, structure, and physicochemical properties were evaluated using *in silico* tools, filtering out those with low antimicrobial activity or high hemolytic effect. Furthermore, molecular docking studies were conducted between the analogs and bacterial membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Bioinformatic analyses revealed that most of the designed analogs exhibited a lower hemolytic effect and higher antimicrobial activity than the Lineatina-2 peptide. Additionally, the docking results suggest that the analogs have a greater affinity for Gram-positive bacterial membranes. Therefore, the *in silico* evaluation conducted in this study, employing rational design strategies, successfully generated analogs with greater antimicrobial potential and reduced hemolytic effects, underscoring their viability as promising candidates for developing new therapeutic agents.

KEYWORDS: Antimicrobial peptides, lineatina-2, rational design, *in silico* tools, analogous.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son biomoléculas esenciales en la defensa innata de los organismos y están compuestos por secuencias específicas de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos (Beltrán, 2019). Estos oligopéptidos, que varían en longitud entre 5 y 40 aminoácidos, generalmente presentan una carga neta positiva que oscila entre +2 y +9, así como una estructura anfipática que les permite interactuar eficazmente con las membranas celulares de los microorganismos (Beltrán, 2019; Tossi et al., 2000). La capacidad de los AMPs para adoptar diversas estructuras secundarias, incluyendo hélices α , hojas β , estructuras extendidas y bucles, es fundamental para su actividad antimicrobiana, siendo las hélices α y las hojas β las más prominentes (Bahar & Ren, 2013).

Los péptidos de defensa del huésped (HDP, por sus siglas en inglés) constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato contra microorganismos (Sharma et al., 2022; Cantillo & Navarro, 2016). Estos péptidos representan una alternativa prometedora en el desarrollo de nuevos antibióticos, debido a su capacidad para atacar rápidamente a una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos, parásitos e incluso virus (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006). Esta versatilidad los hace efectivos contra patógenos resistentes, debido a su acción directa sobre las membranas celulares, esenciales para la supervivencia microbiana (Bahar & Ren, 2013).

1.1.1. Mecanismo de acción

Los péptidos antimicrobianos actúan mediante dos enfoques principales: disruptores y no disruptores de la membrana (Cantillo & Navarro, 2016). Los AMPs no disruptores son transportados a través de canales específicos en las membranas celulares mediante procesos de endocitosis hacia el citoplasma (Brogden, 2005). Una vez allí, despliegan su

actividad al inhibir varios procesos celulares claves, tales como: la síntesis de ADN, ARN y proteínas, el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular (Rollins-Smith, 2009).

En cambio, los disruptores de membrana perturban directamente la permeabilidad celular mediante la formación de poros y suelen tener estructuras en α -hélice (Xu & Lai, 2015). Inicialmente, estos péptidos poseen estructuras desordenadas en una solución acuosa y llegan a formar una estructura secundaria anfipática debido a fuerzas electrostáticas que genera la unión entre los restos peptídicos cargados positivamente y los grupos lipídicos cargados negativamente en la membrana (Cantillo & Navarro, 2016). Posteriormente, a medida que la concentración local relativa del péptido disminuye, estos permanecen inactivos en un estado superficial paralelo a la membrana y al aumentar la concentración local relativa, los péptidos se activan y se orientan perpendicularmente a la membrana, en la cual esta inserción altera la permeabilidad de la bicapa lipídica al formar poros (Conlon & Mechkarska, 2014).

Actualmente, se conocen cuatro modelos principales que explican la ruptura de membrana causadas por los AMPs: el modelo de alfombra, el modelo de duela de barril, el modelo de poro toroidal y el mecanismo tipo detergente (Bahar & Ren, 2013; Cantillo & Navarro, 2016). En el modelo de alfombra, los péptidos se adhieren inicialmente a la superficie de la membrana, cubriendo una pequeña área y al acumularse, penetran la bicapa lipídica formando poros (Bahar & Ren, 2013). En el modelo de duela de barril, los péptidos se insertan en la membrana en una orientación transmembrana, agregándose para formar un poro de canal iónico tradicional (Jenssen et al., 2006; Mahlapuu et al., 2016). Por otro lado, en el modelo de poro toroidal, los péptidos se alinean perpendicularmente en la bicapa, con regiones hidrofóbicas en el centro y regiones hidrofílicas orientadas hacia el poro (Bahar & Ren, 2013). Finalmente, el mecanismo tipo detergente, los péptidos se agrupan sobre la superficie de la membrana, formando una alta concentración local que desestabiliza la bicapa, fragmentándola en micelas, un proceso que se asemeja a la acción de los detergentes (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

1.1.2. AMPs en anuros

Los péptidos antimicrobianos son moléculas presentes en una amplia gama de organismos vivos, incluyendo bacterias, hongos, insectos, vertebrados y plantas (Mahlapuu et al., 2016; Peters et al., 2010). Aunque existe una gran diversidad de AMPs, se ha observado un interés particular en los péptidos antimicrobianos presentes en anuros, ya que estos péptidos bioactivos encontrados en las secreciones cutáneas de los anfibios constituyen una rica fuente de compuestos farmacéuticos, debido a que poseen una amplia variedad de actividades biológicas, que incluyen propiedades antibacterianas, antitumorales, antifúngicos, antiparasitarias, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Rollins-Smith, 2009). La piel de los anfibios alberga una amplia variedad de AMPs, que se clasifican según su secuencia de aminoácidos (Xu & Lai, 2015). Algunos de los AMPs más destacados en la literatura incluyen las *dermaseptinas*, *filoseptinas*, *plasticinas*, *filoxinas*, *cruzioseptinas* y *lineatinas* (Conlon & Mechkarska, 2014; Cuesta et al., 2021; Yambay, 2022).

1.1.3. Limitaciones en los péptidos antimicrobianos.

Los AMPs ofrecen múltiples ventajas en la lucha contra infecciones (Bahar & Ren, 2013; Brogden, 2005). Sus propiedades los convierten en candidatos prometedores para combatir infecciones resistentes a los antibióticos convencionales. Sin embargo, su aplicación clínica enfrenta diversos desafíos que requieren soluciones innovadoras.

Uno de los principales retos en el diseño de los AMPs es lograr un equilibrio adecuado entre sus características fisicoquímicas, como la cationicidad, la hidrofobicidad y la anfipaticidad (Mahlapuu et al., 2020). Estos parámetros son cruciales para garantizar su eficacia antimicrobiana, al tiempo que se minimizan efectos adversos, como la citotoxicidad en células eucariotas, como la hemólisis en eritrocitos (Beltrán, 2019). La optimización de estas propiedades implica un proceso de ensayo y error, donde pequeños cambios en la secuencia peptídica pueden alterar significativamente su actividad y selectividad.

Además, los AMPs poseen una falta de selectividad contra cepas específicas, lo que puede generar efectos no deseados en el microbiota beneficioso del huésped (Eckert et al., 2006). También son susceptibles a la degradación por enzimas proteolíticas presentes en los entornos fisiológicos, lo que reduce su estabilidad y eficacia (Sieprawska-Lupa et al., 2004). A esto se suma la aparición de resistencia bacteriana frente a algunos AMPs, un fenómeno que, aunque menos común que con los antibióticos tradicionales, puede comprometer su efectividad a largo plazo (Bader et al., 2005). Por otro lado, la producción a gran escala de AMPs puede ser costosa, limitando su disponibilidad y acceso (Mahlapuu et al., 2020). Por estas razones, las estrategias de diseño de AMPs se centran en crear nuevos análogos peptídicos con características que optimicen su capacidad para combatir patógenos mientras se minimiza el riesgo de toxicidad en entornos fisiológicos.

1.1.4. Diseño de análogos

El diseño racional de los AMPs representa un enfoque avanzado para crear agentes terapéuticos innovadores con mayor eficacia y menor toxicidad, ideales para enfrentar infecciones resistentes a los antibióticos (Hicks et al., 2007). Este proceso se basa en la optimización de las propiedades fisicoquímicas de los AMPs, como la cationicidad, la hidrofobicidad y la anfipaticidad, que son esenciales para garantizar su actividad antimicrobiana y selectividad frente a las células microbianas (Mwangi et al., 2023). Se han utilizado diversas técnicas de modificación en los AMPs, como la sustitución de aminoácidos (Dathe et al., 2001), ciclación (Chan et al., 2013), halogenación (Gottler & Ramamoorthy, 2009), acetilación (Han et al., 2021) y peptidomiméticos (Areiza, 2003). Entre estas estrategias, la sustitución del contenido de aminoácidos es especialmente investigada, con el fin de optimizar la secuencia del péptido original.

1.1.4.1. Estrategias de modificación dirigida al sitio

El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos mediante sustituciones dirigidas al sitio se centra en la sustitución de aminoácidos que aumenten la actividad antimicrobiana y reduzcan la hemólisis (Ong et al., 2014; Cutrona et al., 2015). Por ejemplo, el péptido

melitina, derivado del veneno de abeja, ha sido modificado para reducir su toxicidad hemolítica sin perder actividad antimicrobiana mediante la sustitución selectiva de aminoácidos en sus extremos hidrofóbicos (Ramos & Cornejo, 2024). Otro caso es la modificación del AMP LL-37, un péptido humano, para aumentar su especificidad contra bacterias Gram negativas, en la cual se realizaron sustituciones en residuos específicos, lo que permitió reducir significativamente su hemólisis mientras mantenía su eficacia antimicrobiana (Santos et al., 2021). Estas estrategias resaltan la capacidad de las modificaciones dirigidas al sitio para transformar AMPs naturales en agentes terapéuticos más seguros y efectivos.

1.1.4.2. Análogos con mayor cationicidad

Al aumentar la cationicidad de un AMPs mediante la sustitución de aminoácidos neutros, hidrofóbicos o menos hidrofílicos por aminoácidos básicos, especialmente lisina (Lys) o arginina (Arg) (Cutrona et al., 2015). Estas modificaciones logran mejorar su actividad antimicrobiana al fortalecer la interacción electrostática con las membranas bacterianas cargadas negativamente y disminuyen el índice hemolítico, minimizando la toxicidad hacia las células humanas (Du et al., 2014; Jiang et al., 2008). Por ejemplo, el análogo peptídico de cruzioseptina 1, denominado [K4K15]CZS-1 obtuvo un alto efecto antimicrobiano contra *S. aureus* (CIM=4 µM), luego de incrementar su cationicidad de +3 a +6, mediante sustituciones de aminoácidos básicos (Bermúdez, 2021). Así mismo, Guo et al., (2018) diseñaron cuatro análogos, denominados A837, A838, A839 y A840 del péptido BMAP-28, mediante la sustitución de aminoácidos neutros por básicos para obtener una mayor cationicidad, mejorando no solo su capacidad antimicrobiana, sino que también disminuyendo la resistencia bacteriana (Guo et al., 2018). Estos casos destacan cómo el control de la cationicidad puede potenciar la eficacia antimicrobiana y minimizar los efectos adversos.

1.1.4.3. Análogos con modulación de la hidrofobicidad

Al diseñar nuevos péptidos sintéticos, la hidrofobicidad influye en la actividad y selectividad de las moléculas de AMP, por estas razones se debe ajustar la

hidrofobicidad mediante la sustitución de aminoácidos lipofílicos en el lado cargado positivamente de un AMP dentro de una ventana óptima de modificación (Andreev et al., 2018; Uggerhøj et al., 2015). Tal como lo realizaron Bea, R. y sus colaboradores en el 2017, al diseñar siete análogos del péptido IsCT1 e IsCT2 con sustituciones de alanina, valina y leucina en las posiciones del lado hidrofóbico, logrando obtener al análogo IsCTL1, con una hidrofobicidad de 0,682 en comparación de 0,818 del péptido original. Este análogo mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en concentraciones inferiores a 25 µg/mL. Aunque, IsCTL1 presentó una mayor actividad antimicrobiana, también exhibió una toxicidad similar a la de los péptidos originales (De la Salud Bea et al., 2017). Por ello, es necesario establecer un umbral para la modulación de la hidrofobicidad, ya que un aumento excesivo de la hidrofobicidad incrementa la hemólisis, mientras que una disminución compromete la actividad antimicrobiana (Chen et al., 2007).

1.1.4.4. Análogos peptídicos CPPs.

Los péptidos bioactivos (BAP, por sus siglas en inglés) comprenden dos clases principales: los péptidos antimicrobianos (AMPs) y los péptidos penetrantes en células (CPPs, por sus siglas en inglés) (Sachon et al., 2021). El sello distintivo de los CPPs es la abundancia de residuos básicos (Arg y Lys) y/o Trp; en especial los CPPs con residuos de Arg, ya que son más activos contra las bacterias y pueden penetrar mejor en la célula formando poros en la membrana (De Cena et al., 2022; Troeira et al., 2007). Por ejemplo, Souza, P. y colaboradores en el 2020, diseñaron diferentes análogos peptídicos de la Quitinasa de *A. thaliana* a través del servidor CellPPD, en la cual PepGAT y PepKAA demostraron capacidad para penetrar en las células, una buena proporción hidrofóbica (40%) y un bajo índice de Boman ($\leq 2,5$), características esenciales para la actividad antimicrobiana y a su vez PepGAT fue más efectivo contra las bacterias, gracias a su mayor contenido de arginina en la secuencia peptídica (Souza et al., 2020).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública global, siendo calificada por expertos como "la pandemia silenciosa del siglo XXI" (Medina, 2022). En 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó que el uso inapropiado de antibióticos, la falta de vigilancia en salud pública, el desconocimiento sobre los fármacos y la escasa implicación gubernamental son algunas de las causas más significativas de esta resistencia (OMS, 2023). Estos factores han propiciado el surgimiento de microorganismos resistentes a una amplia variedad de antibióticos, lo que complica el tratamiento de infecciones comunes y pone en riesgo la efectividad de intervenciones médicas esenciales (Medina, 2022).

La RAM es una preocupación global en constante aumento, debido a la resistencia de bacterias, virus, hongos y parásitos a los medicamentos (Giono-Cerezo et al., 2020). Actualmente, se estima que cada año ocurren cerca de 30 millones de casos de sepsis a nivel mundial, de los cuales alrededor de 5 millones resultan en muertes debido a infecciones por cepas resistentes a los antibióticos convencionales (Vélez et al., 2021). En Ecuador, entre 2014 y 2017, se registraron 55,106 casos de infecciones resistentes en hospitales, siendo los patógenos más comunes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (CRN-RAM-INSPI, 2018). En particular, en el Hospital José María Velasco Ibarra en Tena-Napo, se reportó un número de consultas por infecciones del tracto urinario causadas por patógenos resistentes a los antimicrobianos, como *Escherichia coli*, que representa el principal patógeno con una incidencia que oscila entre el 58% y el 76% de los casos (Vargas & Andrade, 2018). Esta problemática se atribuye conjuntamente a las causas presentadas por la OMS.

Por esta razón, se recurre al uso de péptidos antimicrobianos como una estrategia para enfrentar las infecciones causadas por diversos patógenos, incluyendo bacterias, virus y hongos, ya que los AMPs actúan alterando la integridad de las membranas celulares o inhibiendo funciones celulares específicas, ofreciendo una alternativa a los

antibióticos convencionales (Mahlapuu et al., 2016). Sin embargo, los AMPs presentan algunas limitaciones, tales como su toxicidad para el organismo huésped, la sensibilidad a las condiciones ambientales adversas (susceptibilidad a las proteasas y el pH extremo), el problema de plegamiento de algunos AMPs grandes, su alto costo de producción, entre otros (Bahar & Ren, 2013). Por ello, el diseño racional de péptidos antimicrobianos juega un papel crucial en la búsqueda de soluciones efectivas, ya que este enfoque permite desarrollar péptidos con propiedades específicas, promoviendo su eficacia y aplicabilidad en el tratamiento de diversas infecciones (Mahlapuu et al., 2020).

1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Debido al incremento de enfermedades infecciosas, surge la necesidad de abordar nuevos agentes terapéuticos para contrarrestar la emergencia de cepas resistentes y la escasez de nuevos fármacos antimicrobianos (León, 2021). Bajo estas circunstancias, los AMPs se presentan como una alternativa prometedora para el tratamiento de estas infecciones, ya que poseen una buena estabilidad térmica, solubilidad en el agua, bajo peso molecular, una relación estructura-actividad favorable y amplio espectro de acción (Rončević et al., 2019). Sin embargo, para su aplicación deben superar varios desafíos, como se mencionó anteriormente en las limitaciones (Bahar & Ren, 2013).

Es por ello, que la implementación de técnicas computacionales avanzadas facilita el diseño racional de nuevos análogos peptídicos, emergiendo como estrategia clave para mejorar los péptidos naturales, mediante el uso de diferentes herramientas *in silico* que permiten la optimización de las propiedades fisicoquímicas, un aumento significativo en la actividad antimicrobiana y la reducción del potencial hemolítico en los AMPs (Barreto et al., 2019). Este enfoque contribuye a una selección más efectiva de candidatos y ahorra recursos al descartar aquellos que podrían presentar problemas en ensayos posteriores (Beltrán, 2019).

En este contexto, para el presente trabajo se utilizará como arquetipo a Lineatina-2, el cual fue descubierta en las secreciones cutáneas de *Lithodytes lineatus*, siendo uno de

los tres péptidos identificados hasta la fecha en esta especie de anuro. Lineatina-2 está compuesta por 22 aminoácidos, exhibe una alta tendencia a adoptar una estructura α -helicoidal y es anfipática, con una carga neta de +4,1, lo que la hace idónea para interactuar con la membrana bacteriana (Yambay, 2022). Además, lineatina-2 comparte características estructurales e hidrofóbicas con otros péptidos antimicrobianos y demostró una destacada actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (CIM = 6,5 μ M), *Staphylococcus aureus* (CIM = 1,6 μ M) y *Candida albicans* (CIM= 12,9 μ M), induciendo la muerte celular por necrosis en estos microorganismos (Yambay, 2022). Así mismo, este péptido sintético presentó un bajo efecto hemolítico contra de *E. coli* y *S. aureus*, con una concentración hemolítica media (CH_{50}) de 45,7 μ M (Yambay, 2022). En este sentido, se plantea diseñar de manera *in silico* nuevos análogos peptídicos basados en Lineatina-2 con un mayor potencial antimicrobiano y una toxicidad reducida.

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. Objetivo General

Diseñar análogos del péptido lineatina-2 mediante el uso de herramientas *in silico* para mejorar la actividad antimicrobiana y reducir su potencial hemolítico.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar análogos peptídicos de Lineatina-2 mediante la sustitución estratégica de aminoácidos con el propósito de mejorar y optimizar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales.
- Evaluar el potencial antimicrobiano y la capacidad hemolítica de los análogos de Lineatina-2 utilizando herramientas *in silico*.
- Seleccionar los análogos más prometedores con mayor actividad antimicrobiana y toxicidad reducida.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Estrategias de diseño

En este estudio, el péptido antimicrobiano Lineatina-2 caracterizado en la rana *Lithodytes lineatus*, fue utilizado como arquetipo para el diseño de una amplia gama de análogos. Para ello, se analizó la secuencia **ILPLLITAAKVIPKIHSFFKNL** utilizando herramientas bioinformáticas que permitieron identificar características clave para su modificación racional (Anexo A).

Se empleó [HeliQuest](#) (Gautier et al., 2008) para identificar las caras hidrofóbica e hidrofílica mediante la representación gráfica en una rueda helicoidal y se obtuvo diferentes parámetros claves como la hidrofobicidad y la carga neta. Además, se utilizó [PepDraw](#) (Freeman & Badani, 2011) para obtener propiedades fisicoquímicas complementarias, como la masa molecular y el punto isoeléctrico.

2.1.1. Estrategia 1: Ajuste de hidrofobicidad y aumento de cationicidad

2.1.1.1. Fase 1: Modificación en cara polar y no polar

En esta primera fase, se optimizaron las propiedades de los análogos peptídicos de Lineatina-2, se realizaron modificaciones tanto en la región polar como en la apolar del péptido, de manera individual. En la región polar, se aumentó la cationicidad sustituyendo aminoácidos neutros por aminoácidos básicos, con el objetivo de potenciar las interacciones electrostáticas (Cutrona et al., 2015). Respecto a la cara apolar, se utilizó el servidor [ExPASy-ProtScale](#) (Gasteiger et al., 2005), junto con la escala de Hydropath / Kyte & Doolittle para identificar los aminoácidos con mayor y menor hidrofobicidad. Con base en estos valores, se realizaron sustituciones dirigidas: los aminoácidos altamente hidrofóbicos se reemplazaron por otros menos hidrofóbicos para reducir la hidrofobicidad, mientras que, para aumentarla, se sustituyeron por

aminoácidos con valores más altos en la escala (De la Salud Bea et al., 2017; Chen et al., 2007).

2.1.1.2. Fase 2: Integración de modificaciones en ambas caras.

La segunda fase se desarrolló bajo la fase 1 como una etapa de refinamiento basada en los resultados obtenidos durante la fase anterior. Debido a que fueron pocos los análogos que lograron buenos valores predictivos al ser modificados únicamente en regiones individuales (cara polar o apolar), se seleccionaron aquellos análogos que destacaron durante el proceso de cribado en la primera estrategia, es decir, aquellos con altos valores de actividad antimicrobiana y un bajo potencial hemolítico en comparación con el péptido original (Figura 1-3). El objetivo principal de esta fase fue diseñar nuevos análogos mediante la integración de modificaciones tanto en la cara polar como en la apolar del péptido para mejorar la anfipaticidad, combinando el aumento de la cationicidad y la modulación de la hidrofobicidad en ambas regiones. Así mismo, los nuevos análogos generados fueron sometidos nuevamente a un proceso de cribado basado en su actividad antimicrobiana, potencial hemolítico y tendencia helicoidal. Aquellos que obtuvieron los mejores resultados fueron seleccionados, mientras que los que mostraron un menor desempeño fueron descartados.

2.1.2. Estrategia 2: Diseño de análogos CPPs

En el diseño de péptidos penetrantes en células (CPPs), se realizaron sustituciones específicas de aminoácidos característicos de los CPPs, como residuos cargados positivamente, entre ellos arginina (Arg) y lisina (Lys), que facilitan las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de las membranas celulares. Además, se introdujeron residuos hidrofóbicos, como leucina (Leu), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp), que favorecen el anclaje del péptido en la membrana y mejoran su eficiencia de penetración (Copolovici et al., 2014; Desale et al., 2021). Cada análogo diseñado fue evaluado mediante la herramienta *in silico* [CellPPD](#) (Gautam et al., 2013), que validó su capacidad predictiva como CPPs a través de algoritmos avanzados (Gautam et al., 2015). Este enfoque no solo potencia su capacidad para actuar como un CPPs eficaz,

sino que optimiza la cationicidad y la hidrofobicidad del péptido, para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

2.2. Proceso de cribado

Se generó una biblioteca de análogos, clasificados en las dos estrategias basadas en sustituciones específicas en la cara polar, la cara no polar. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas potenciales de cada análogo utilizando herramientas *in silico* (Anexo A). Este análisis permitió realizar un cribado exhaustivo basado en umbrales específicos definidos para cada predictor, seleccionando aquellos análogos que obtenían valores de predicción superiores en actividad antimicrobiana, menor hemólisis y mayor tendencia helicoidal, mientras que se descartaron los que presentaban un menor potencial en comparación con el péptido original (Figura 1-3).

2.2.1. Cribado por actividad antibacteriana

Para evaluar el potencial antimicrobiano de los diferentes análogos, se utilizaron tres herramientas de predicción *in silico*: CAMPR3, AntiBP3 y AMPfun, junto con criterios basados en puntuaciones de umbrales específicos mayores al péptido original para su clasificación.

[CAMPR3](#) es una herramienta diseñada para la predicción y clasificación de péptidos antimicrobianos al utilizar algoritmos de Support Vector Machines (SVM), Random Forest (RF) y Discriminante Lineal (LDA) mediante el análisis de secuencias, las características fisicoquímicas y estructurales de los péptidos (Waghu et al., 2016; Waghu & Idicula-Thomas, 2020). Para esta herramienta, se aplicó un umbral de selección específico de $AB \geq 0.980$ mayor al péptido original (Anexo A). Por otra parte, [AntiBP3](#) emplea técnicas Support Vector Machines (SVM) y Artificial Neural Network (ANN) para identificar y clasificar péptidos con potencial de actividad antibacteriana (Bajjiya et al., 2024). En este caso, se utilizó un umbral de selección de $AB \geq 0.80$ para clasificar los análogos evaluados (Anexo A). Finalmente, [AMPfun](#) integra algoritmos como Support Vector Machines (SVM), Artificial Neural Network (ANN) para predecir la actividad

antimicrobiana y otras propiedades biológicas de los péptidos (Chung et al., 2019). Para esta herramienta se aplicó un umbral de selección de $AB \geq 0.920$, destacando aquellos análogos que cumplieran con este criterio (Anexo A). Al trabajar con diferentes algoritmos de predicción, estas herramientas ofrecieron una evaluación complementaria que permitió identificar los análogos con mayor potencial en términos de actividad antibacteriana.

2.2.2. Cribado por actividad hemolítica

Para evaluar el potencial hemolítico, se utilizaron dos herramientas bioinformáticas aplicando los umbrales específicos. [HAPPENN](#) utiliza algoritmos de aprendizaje automático, como Artificial Neural Network (ANN), Support Vector Machines (SVM) y Random Forest (RF) para predecir la actividad hemolítica de péptidos de manera *in silico* (Timmons & Hewage, 2020). En esta herramienta se aplicó un umbral de selección de $AH \leq 0,500$ para clasificar los mejores análogos. Así mismo, [DBAASP](#) emplea algoritmos basados en aprendizaje automático mediante el análisis de las características fisicoquímicas y estructurales de los péptidos (Pirtskhalava et al., 2021). En este caso, se aplicó el umbral de selección como "No activo" para los eritrocitos (Anexo A). Cada servidor emplea algoritmos de predicción diferentes, ambos proporcionaron un análisis complementario que permitió evaluar el riesgo hemolítico de los análogos, facilitando la selección de aquellos con menor potencial tóxico.

2.2.3. Cribado por Helicidad

En esta parte, se empleó la herramienta [PRABI](#) (CNRS-UCBL, 2021), para analizar la tendencia helicoidal de los análogos. PRABI permite predecir la propensión de una secuencia peptídica a adoptar una estructura helicoidal en solución (CNRS-UCBL, 2021). Con base a este análisis, se seleccionaron aquellos análogos que presentaron una probabilidad igual o superior al 50%, superando así la tendencia helicoidal del péptido original.

2.3. Modelado estructural de los análogos prometedores

Para los análogos prometedores se realizó la predicción de la estructura secundaria junto con el servidor [JPred4](#) (Drozdetskiy et al., 2015), el cual emplea el algoritmo JNet, basado en redes neuronales simples y alineaciones múltiples de secuencias, para predecir estructuras secundarias con alta precisión. En cuanto al modelado tridimensional de las secuencias, se utilizó [AlphaFold](#) (Nussinov et al., 2022), un software vanguardia basado en inteligencia artificial con modelado por redes neuronales profundas, que permitió generar modelos 3D de los análogos con alto grado de confianza y precisión.

2.4. Acoplamiento Molecular

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular para dilucidar el posible mecanismo de acción de los análogos prometedores en membranas objetivo: La membrana bacteriana Gram negativa (PDB: 2W6D) se extrajo del PDB Protein Bank, mientras que la membrana Gram positiva fue obtenida de CHARMM-GUI (Jo et al., 2008). Para ello, se utilizaron los modelos de las estructuras tridimensionales de los análogos obtenidos en AlphaFold y se limpiaron las estructuras de las membranas en UCSF Chimera (Pettersen et al., 2021). Seguidamente, se prepararon los complejos para el acoplamiento molecular utilizando AutoDockTools, donde se añadieron cargas y átomos de hidrógeno tanto al péptido como a las membranas. La energía de interacción se expresó en términos de afinidad (kcal/mol) calculada por AutoDock Vina (v.1.2.5) (Forli et al., 2016).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Proceso algorítmico para la selección de análogos prometedores

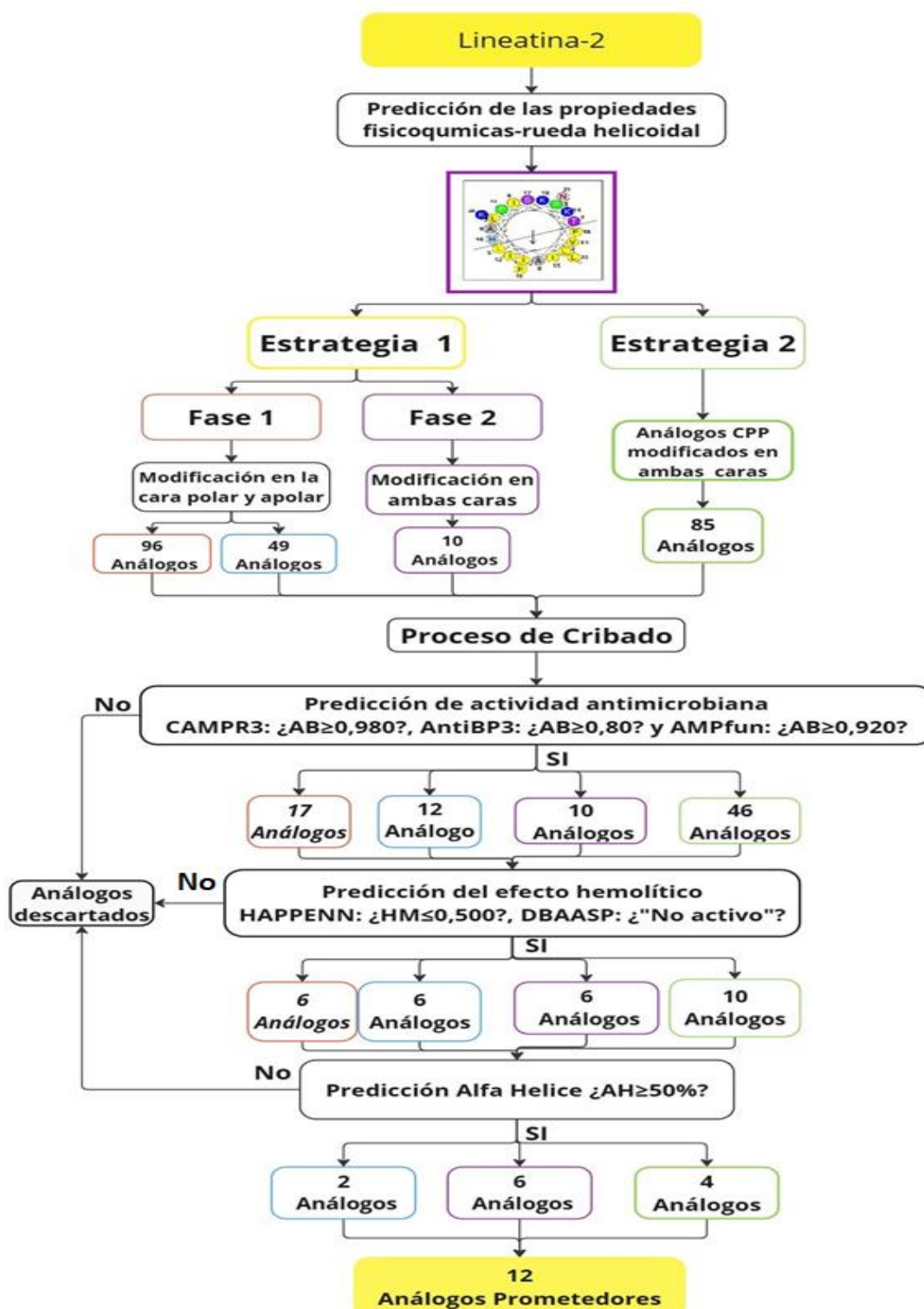


Figura 1-3: Algoritmo de selección de análogos prometedores mediante cribados. Cada estrategia fue clasificada en categorías de color rojo-celeste, morado y verde, respectivamente, y posteriormente se cribó utilizando los parámetros AB, AH y hélice alfa. El número de análogos generados se muestra en cada nivel. Realizado por Silva, 2024.

A partir de las distintas sustituciones realizadas en Lineatina-2, se generó una biblioteca de análogos peptídicos organizada en dos estrategias establecidas. Esta biblioteca, compuesta por 230 secuencias en total, fue sometida a un proceso de cribado que permitió descartar los análogos no deseables y seleccionar los más prometedores (Figura 1-3).

3.2. Estrategia 1: Ajuste de hidrofobicidad y aumento de cationicidad

3.2.1. Fase 1: Modificación en cara polar y no polar

Se generó una biblioteca con modificaciones en la cara polar (Anexo B) y la cara no polar (Anexo C) que generaron 96 y 49 análogos, respectivamente. El proceso de cribado (Figura 1-3) redujo el número de análogos a 2 con modificaciones en la cara apolar, considerándolos como prometedores en esta estrategia (Tabla 1-3).

3.2.2. Fase 2: Integración de modificaciones en ambas caras.

En la segunda estrategia se combinaron las modificaciones tanto en la cara polar y apolar de Lineatina-2 generando 10 análogos (Anexo D). Tras filtrar los análogos combinados quedaron 6 análogos, siendo los más idóneos (Tabla 1-3).

3.3. Estrategia 2: Diseño de análogos CPP

En esta estrategia se generaron 85 análogos con modificaciones en ambas caras (Anexo E). Durante el proceso de cribado se descartaron los análogos no deseables y se seleccionaron 4 análogos en total como los más prometedores (Tabla 1-3).

3.4. Análogos prometedores

A través del proceso de cribado en cada estrategia, se lograron seleccionar 12 análogos prometedores (Tabla 1-3). Estos análogos demostraron mejoras significativas en comparación con el péptido original, como una mayor carga neta, que varían entre +4 y +8, y una menor hidrofobicidad, en un rango de 0,352 a 0,493. Así mismo, las estructuras de los análogos evidenciaron una propensión superior al 55% a adoptar una conformación de α -hélice (Tabla 2 - 3). Además, los análogos demostraron valores positivos en la predicción de péptidos penetrantes en células (CPP) (Tabla 3-3), junto con una actividad antimicrobiana mejorada (Tabla 4-3) y un potencial hemolítico reducido (Tabla 5 -3).

Tabla 1-3: Secuencias de análogos prometedores. Los aminoácidos reemplazados en los análogos fueron resaltados en negro.

Péptido	Secuencia	Estrategia
Lineatina-2	ILPLLITAAKVIPKHSFFKNL-NH2	Original
4A5A	ILP AA ITAAKVIPKHSFFKNL-NH2	1
2A4A5A	I APAA ITAAKVIPKHSFFKNL-NH2	1
4A5A11K13A15K	ILP AA ITAAK KIAK HSFFKNL-NH2	1
2A4A5A11K13A19K	I APAA ITAAK KIAK HSFFKNL-NH2	1
4A11K13A19K	ILP AL ITAAK KIAK HSFFKNL-NH2	1
2A3K5A11K13A19K	I AKL ITAAK KIAK HSFFKNL-NH2	1
4A5A11K13A	ILP AA ITAAK KIAK HSFFKNL-NH2	1
4A5A7R14A15K	ILP AAI RAAKV IAK HSFFKNL-NH2	1
1G3R6E7K17K21R	GLR LLEKAAKV IAK HKFFKRL-NH2	2
3R5R6E13A17K21R	IL R LREKAAKV IAK HKFFKRL-NH2	2
1F3R6E7K13A17G21R	FLR LREKAAKV IAK HGFFKRL-NH2	2
1K3R6E7W8R13A17R21R	KLR LLEWRAKV IAK HRFFKRL-NH2	2

Realizado por: Silva, 2024.

Tabla 2-3: Propiedades fisicoquímicas de los análogos prometedores. Los valores fueron obtenidos con Pepdraw, y HeliQuest y la helicidad se midió con PRABI.

Estrategia	Péptido	Masa (g/mol)	Carga a PH 7.4	Hidrofobicidad	Helicidad (%)	PI
Original	Lineatina-2	2475,5298	4	0,802	50,00%	10,89
1	4A5A	2391,4363	4	0,675	59,09%	10,89
1	2A4A5A	2349,3895	4	0,612	59,09%	10,89
1	4A5A11K13A15K	2409,4581	6	0,430	63,64%	11,17
1	2A4A5A11K13A19K	2333,4269	6	0,367	81,82%	11,17
1	4A11K13A19K	2417,5205	6	0,493	86,36%	11,17
1	2A3K5A11K13A19K	2406,5158	7	0,352	100,00%	11,26
1	4A5A11K13A	2394,4472	5	0,556	90,91%	11,05
1	4A5A7R14A15K	2435,485	6	0,472	63,64%	11,86
2	1G3R6E7K17K21R	2578,6269	7	0,393	100,00%	11,74
2	3R5R6E13A17K21R	2677,7064	8	0,352	100,00%	12,25
2	1F3R6E7K13A17G21 R	2640,6175	7	0,396	100,00%	12,24
2	1K3R6E7W8R13A17 R21R	2820,7547	8	0,435	100,00%	12,50

Realizado por: Silva, 2024.

Tabla 3-3: Análogos con mayor penetración con la membrana. Estos valores fueron obtenidos por el servidor CellPPD: Designing of Cell Penetrating Peptides, en la cual se destacan los análogos de la estrategia 2.

Estrategia	Péptido	ACTIVIDAD CPP CellPPD	Predicción
Original	Lineatina-2	-0,20	Non-CPP
1	4A5A	-0,12	Non-CPP
1	2A4A5A	-0,15	Non-CPP
1	4A5A11K13A15K	-0,17	Non-CPP
1	2A4A5A11K13A19K	-0,09	Non-CPP
1	4A11K13A19K	-0,11	Non-CPP
1	2A3K5A11K13A19K	-0,18	Non-CPP
1	4A5A11K13A	-0,20	Non-CPP
1	4A5A7R13A15K	-0,07	Non-CPP
2	1G3R6E7K17K21R	0,34	CPP
2	3R5R6E13A17K21R	0,28	CPP
2	1F3R6E7K13A17G21R	0,25	CPP
2	1K3R6E7W8R13A17R21R	0,34	CPP

Realizado por: Silva, 2024.

Tabla 4–3: Predicción de actividad de los análogos prometedores. Los valores representados en la tabla son probabilidades mejoradas al péptido original.

Estrategia	Péptido	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA		
		CMR3	ANTIBP3	AMPFUN
Original	Lineatina-2	0,973	0,81	0,925
1	4A5A	0,980	0,82	0,934
1	2A4A5A	0,982	0,81	0,925
1	4A5A11K13A15K	0,988	0,78	0,968
1	2A4A5A11K13A19K	0,987	0,77	0,965
1	4A11K13A19K	0,990	0,87	0,965
1	2A3K5A11K13A19K	0,990	0,93	0,955
1	4A5A11K13A	0,989	0,83	0,968
1	4A5A7R13A15K	0,990	0,83	0,960
2	1G3R6E7K17K21R	0,992	0,82	0,939
2	3R5R6E13A17K21R	0,994	0,86	0,925
2	1F3R6E7K13A17G21R	0,991	0,88	0,931
2	1K3R6E7W8R13A17R21R	0,996	0,81	0,955

Realizado por: Silva, 2024.

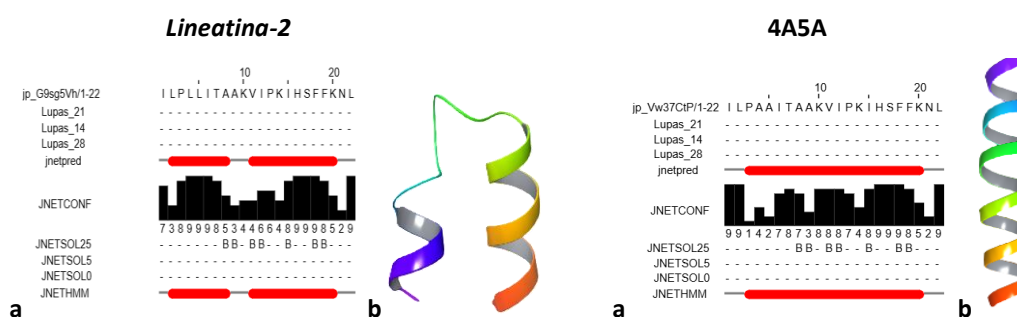
Tabla 5–3: Predicción del potencial hemolítico de los análogos prometedores. Los valores representados en la tabla son probabilidades mejoradas al péptido original.

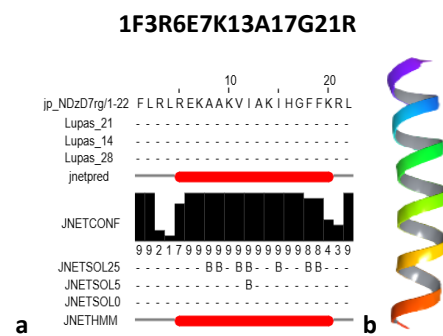
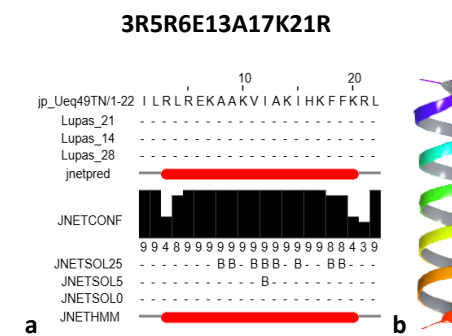
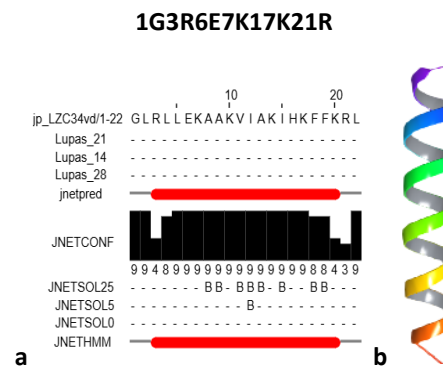
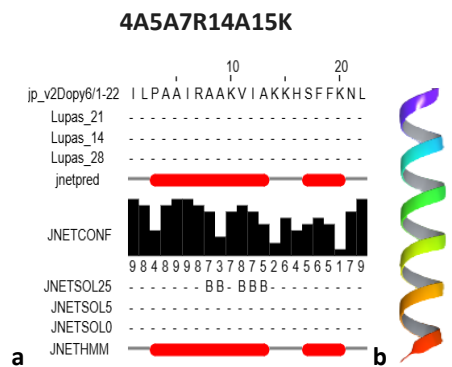
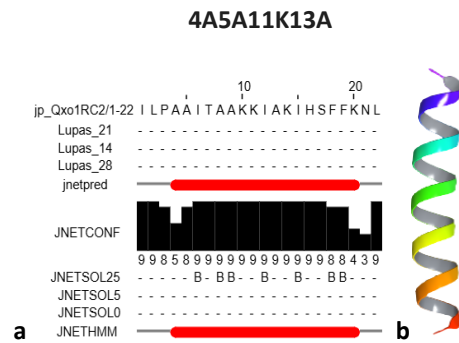
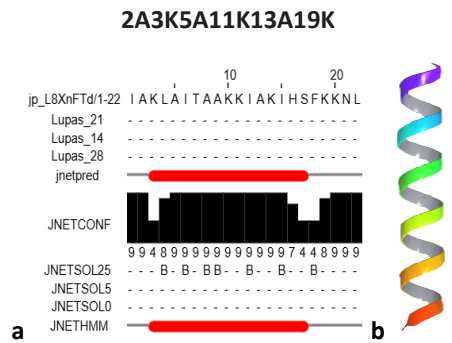
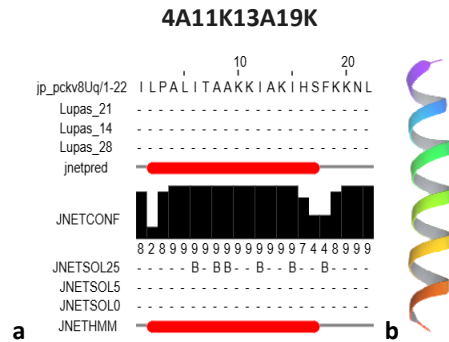
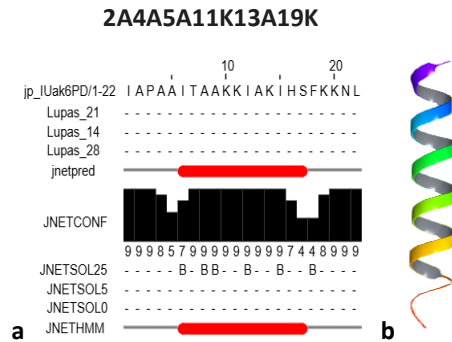
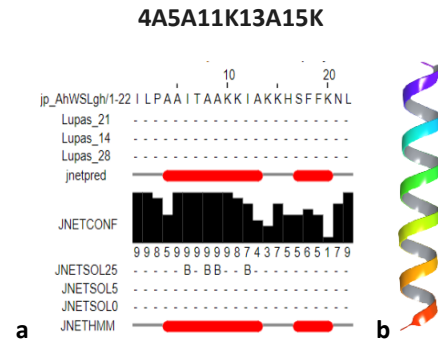
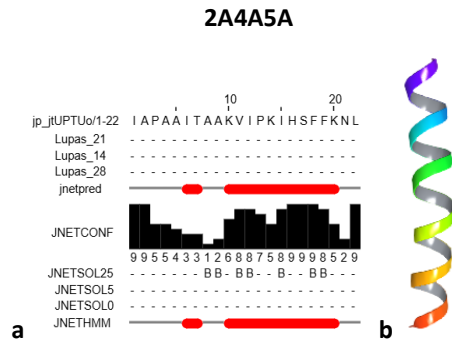
Estrategia	Péptido	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA		
		HAPPENN	DBAASP	A. Eritrocito
Original	Lineatina-2	0,978	0,64	Activo
1	4A5A	0,250	0,58	No Activo
1	2A4A5A	0,034	0,57	No Activo
1	4A5A11K13A15K	0,048	0,64	No Activo
1	2A4A5A11K13A19K	0,006	0,68	No Activo
1	4A11K13A19K	0,415	0,56	No Activo
1	2A3K5A11K13A19K	0,147	0,61	No Activo
1	4A5A11K13A	0,106	0,57	No Activo
1	4A5A7R13A15K	0,072	0,59	No Activo
2	1G3R6E7K17K21R	0,180	0,63	No Activo
2	3R5R6E13A17K21R	0,030	0,59	No Activo
2	1F3R6E7K13A17G21R	0,049	0,70	No Activo
2	1K3R6E7W8R13A17R21R	0,052	0,68	No Activo

Realizado por: Silva, 2024.

3.5. Modelamiento Estructural

Para identificar la estructura secundaria y los modelos tridimensionales de los análogos más prometedores, se utilizaron las herramientas JPred4 y AlphaFold, respectivamente. Las predicciones de JPred4 revelaron una marcada tendencia helicoidal en los análogos diseñados, con altos niveles de confianza en los resultados (Figura 2-3 a). Por su parte, los modelos 3D generados por AlphaFold mostraron una consistencia significativa, destacando una estructura más definida y estable en comparación con el péptido original (Figura 2-3 b). En particular, los análogos presentan un esqueleto helicoidal más continuo, mientras que el péptido original muestra un centro menos estructurado, lo cual representa una mayor fiabilidad en la selección de los análogos. Además, para evaluar la calidad de los modelos generados por AlphaFold, se consideraron dos métricas claves: el pLDDT (predicted Local Distance Difference Test), que mide la confianza en la precisión de la estructura local, y el pTM (predicted Template Modeling score), que evalúa la confianza en la predicción de la estructura global. Entre los análogos generados, el análogo 2A3K5A11K13A19K destacó por sus buenos valores en ambas métricas (pLDDT = 90.3 y pTM = 0.195), lo que garantiza una alta precisión tanto en la estructura local como en la global. Así mismo, a los análogos 1G3R6E7K17K21R y 4A11K13A19K también mostraron una consistencia estructural notable, con valores de pLDDT y pTM que refuerzan la fiabilidad de las predicciones realizadas (Tabla 6-3).





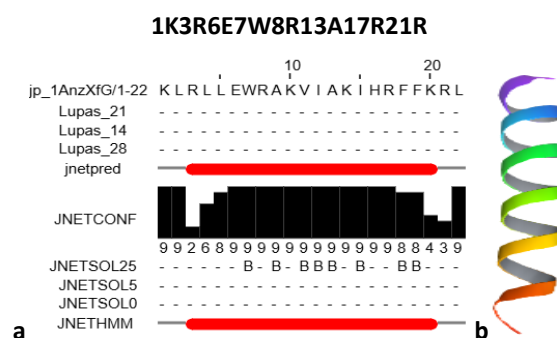


Figura 1-3: Predicción de la estructura de análogos prometedores. Se presenta la estructura secundaria predicha por JPred4 (a), donde las hélices se representan mediante tubos rojos, y la confianza de la predicción, estimada por JNETCONF, alcanza un valor máximo de 9. Por otro lado, los modelos tridimensionales de los análogos, generados con AlphaFold (b), destacan con un borde morado en el extremo N-terminal y rojo en el C-terminal, facilitando la visualización de sus extremos estructurales.

Realizado por: Silva, 2024.

Tabla 6–3: Variables considerables en alphafold.

Péptido	pLDDT	pTM
2A3K5A11K13A19K	90,3	0,195
1G3R6E7K17K21R	89,9	0,192
4A11K13A19K	89,2	0,187
4A5A11K13A	88,1	0,190
4A5A	87,1	0,164

Nota: El análogo **2A3K5A11K13A19K** tuvo buenos valores tanto en la estructura local como global (pLDDT = 90.3 y pTM = 0.195), garantizando una mayor precisión y confiabilidad.

Realizado por: Silva, 2024

3.6. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular realizado con AutoDock Vina permitió evaluar la interacción entre los análogos peptídicos derivados de Lineatina-2 y dos tipos de membranas: la membrana celular bacteriana (PDB: 2W6D) y la membrana Gram positiva. En el caso de la membrana bacteriana Gram negativa, los péptidos se posicionaron en la superficie

de la membrana, sin penetrarla (Tabla 7-3). En contraste, con la membrana Gram positiva, los análogos se insertaron parcialmente (Tabla 8-3). Los valores de afinidad obtenidos reflejan la fuerza de interacción entre el péptido y la membrana; cuanto más negativo es el valor, más fuerte es la interacción. Además, las representaciones gráficas de las interacciones (Figura 3-3) muestran claramente las diferencias observadas del complejo péptido/membrana.

Tabla 7–3: Valores de mayor afinidad energética. Interacción péptido-membrana Gram negativa.

Membrana	Estrategia	Péptido	Valor de afinidad (kcal/mol)
Membrana celular bacteriana (PDB: 2W6D).	Original	Lineatina-2	-4,954
	1	4A5A11K13A	-5,083
	1	4A5A7R13A15K	-5,014
	2	1G3R6E7K17K21R	-5,356
	2	3R5R6E13A17K21R	-5,081
	2	1F3R6E7K13A17G21R	-5,459
	2	1K3R6E7W8R13A17R21R	-5,602

Nota: Los valores de afinidad energética más negativos se observaron en el análogo **1K3R6E7W8R13A17R21R** (-5,602 kcal/mol), lo que indica una interacción fuerte con la superficie de la membrana.

Realizado por: Silva, 2024

Tabla 8–3: Valores de mayor afinidad energética. Interacción péptido-membrana Gram positiva.

Membrana	Estrategia	Péptido	Valor de afinidad (kcal/mol)
Membrana Gram positiva Archivo extraído de CHARM GUI	Original	Lineatina-2	-6,754
	1	4A5A11K13A15K	-7,09
	1	4A5A7R13A15K	-7,018

Nota: La interacción con la membrana Gram positiva mostró que el análogo **4A5A11K13A15K** tuvo mayor afinidad energética (-7,09 kcal/mol), lograron penetrar la membrana.

Realizado por: Silva, 2024

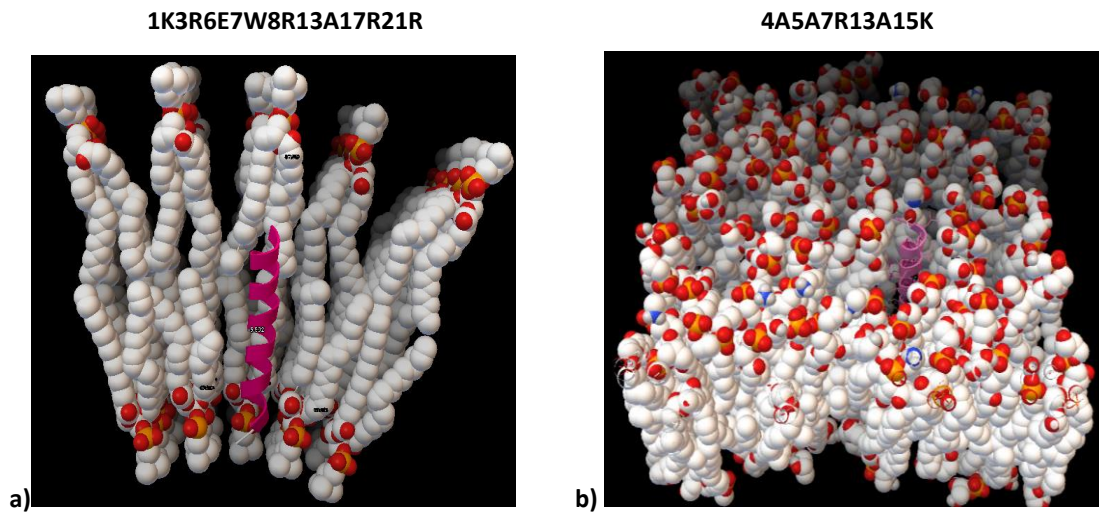


Figura 2-3: Interacción de los análogos peptídicos (rosa) con mayor afinidad energética con la membrana bacteriana (PDB: 2W6D) y la membrana Gram positiva.

a) Interacción del análogo **1K3R6E7W8R13A17R21R** (en rosa) con la membrana celular bacteriana Gram negativa (PDB: 2W6D). Se observa que el péptido permanece en la superficie de la membrana sin penetrarla, indicando una interacción superficial y b) Interacción del análogo **4A5A7R13A15K** (en rosa) con la membrana Gram positiva. En este caso, se evidencia que el péptido logra penetrar la membrana, reflejando una interacción más profunda.

Realizado por: Silva, 2024.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Estrategias de diseño

El diseño racional de péptidos antimicrobianos (AMPs) ha emergido como una estrategia prometedora para superar las limitaciones de los péptidos naturales, como la citotoxicidad y la baja selectividad. A través de la optimización de sus propiedades antimicrobianas, hemolíticas y estructurales, es posible generar análogos con un perfil más favorable para aplicaciones terapéuticas. En este sentido, el péptido Lineatina-2 ha sido usado como modelo para el diseño de nuevos análogos, aprovechando su notable actividad contra diversos patógenos y su baja toxicidad hacia células humanas. En este estudio, se implementaron diversas estrategias de diseño que generaron un total de 230 análogos (Figura 1-3), en la que las modificaciones tanto en la cara hidrofóbica como hidrofílica mantienen o aumentan las probabilidades de actividad.

La primera fase se centró en el aumento de la cationicidad en la cara polar del péptido, a través de la sustitución de aminoácidos neutros por básicos, incrementando significativamente la probabilidad de inhibir el crecimiento microbiano, generando un total de 96 análogos peptídicos (Anexo B). Durante el cribado, algunos análogos mostraron mejoras en su actividad antimicrobiana, sin embargo, la mayoría presentó un alto potencial hemolítico y una pérdida significativa de helicidad, lo que llevó a su descarte. Este efecto se puede atribuir conjuntamente a la modificación exclusiva de la cara polar del péptido y al aumento desmesurado de la carga catiónica, que tiende a distorsionar la estructura helicoidal del péptido, limitando su selectividad y efectividad (Porto et al., 2012; Chen et al., 2005). Por otro lado, las modificaciones realizadas en la cara no polar del péptido consistieron en sustituir aminoácidos hidrofóbicos por otros menos hidrofóbicos, como leucina por alanina, para reducir la hidrofobicidad, y viceversa, para incrementarla. Este método generó un total de 49 análogos peptídicos (Anexo C). Durante el cribado, estas sustituciones permitieron mantener el umbral de actividad antimicrobiana, reducir el potencial hemolítico y preservar la estructura helicoidal. Como resultado de la primera estrategia, solo 2 análogos lograron alcanzar

un equilibrio óptimo entre actividad antimicrobiana, baja hemólisis y conservación de la tendencia helicoidal (Tabla 1-3). Estos hallazgos subrayan la importancia de un diseño estructural balanceado en ambas caras del péptido, ya que promueve una estructura anfipática más funcional y prometedora. (Takahashi et al., 2010; Yin et al., 2012).

Tal es el caso del estudio realizado por Bermúdez en 2021, en el que se destaca el diseño de nuevos análogos peptídicos de la Cruzioseptina-1 (CZS-1) (Bermúdez, 2021). En este trabajo, se realizaron modificaciones para aumentar su cationicidad y ajustar su hidrofobicidad, como es el caso de [K4K15]CZS-1, un análogo con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiproliferativas, además de tener un menor efecto hemolítico en comparación con CZS-1. Estos resultados resaltan cómo las modificaciones estructurales pueden influir directamente en la eficacia antimicrobiana (Bermúdez, 2021).

Es por esto que, en la segunda fase, se utilizaron las mismas posiciones de sustitución que fueron empleadas de manera separada en la cara polar y no polar de la primera fase, con el objetivo de combinar las modificaciones para optimizar la funcionalidad y anfipaticidad del péptido. Así que, se sustituyó alanina para disminuir la hidrofobicidad y lisina para aumentar la actividad antimicrobiana en ambas caras del péptido (Anexo D). Este enfoque generó un total de 10 análogos, los cuales fueron sometidos a un proceso de cribado que evaluó la actividad antimicrobiana, el potencial hemolítico y la estabilidad helicoidal. Como resultado se seleccionaron 6 análogos peptídicos, siendo estos los más prometedores de esta estrategia (Tabla 1-3). Este procedimiento permitió mejorar la capacidad de selección de los análogos, integrando propiedades complementarias en ambas caras del péptido.

Posteriormente, en la segunda estrategia se realizó el diseño de péptidos penetrantes en células (CPP), en la cual se enfocó en el equilibrio entre aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que optimizan propiedades claves como la cationicidad, hidrofobicidad y anfipaticidad, esenciales para potenciar su interacción con las membranas celulares y minimizar efectos adversos (Anexo E). Es por esto, que se sustituyeron estratégicas de distintos aminoácidos, como la glicina y la alanina, que contribuyeron a conferir

flexibilidad estructural, mientras que la inclusión de triptófano y fenilalanina potenció las interacciones hidrofóbicas esenciales con la bicapa lipídica (Copolovici et al., 2014; Desale et al., 2021; Yakubovitch et al., 2004). Así mismo, al incorporar ácido glutámico permitió introducir regiones cargadas negativamente en combinación con aminoácidos básicos como lisina y arginina, favorecieron un diseño balanceado en ambas caras del péptido, incrementando la cationicidad y potenciando la atracción electrostática hacia la membrana bacteriana (De Cena et al., 2022; (Troeira et al., 2007). Estas modificaciones permitieron mantener una estructura helicoidal funcional, lo que es fundamental para su actividad (Copolovici et al., 2014). De esta manera, se obtuvo un total de 85 análogos, los cuales fueron sometidos a un proceso de cribado que evaluó la actividad antimicrobiana, el potencial hemolítico y la estabilidad helicoidal. Como resultado en esta estrategia, se identificaron 4 análogos prometedores que combinaron una mayor afinidad hacia las membranas con un perfil selectivo que minimiza la hemólisis excesiva (Tabla 1-3).

4.2. Evaluación *in silico* de péptidos

El proceso de cribado de los 230 análogos peptídicos generados a través de las dos estrategias se llevó a cabo utilizando diversas herramientas *in silico* (Anexo A). Estas herramientas permitieron optimizar la selección al proporcionar una evaluación integral de las propiedades de los análogos, garantizando la identificación de los candidatos más prometedores. Este enfoque multifacético no sólo mejoró la precisión del proceso de cribado, sino que también aumentó la confiabilidad de los resultados al aprovechar la complementariedad de distintas plataformas computacionales. Según un estudio de Ortiz (2019) sobre el diseño de péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana, se ha demostrado que la aplicación de diversas herramientas *in silico* facilita la identificación de candidatos más efectivos y con menor toxicidad (Ortiz López, 2019). Por esta razón, la combinación de estas herramientas en el cribado de péptidos mejora la predicción de la estructura y función de los péptidos, optimizando su diseño para aplicaciones terapéuticas (Usmani et al., 2018).

4.3. Caracterización de análogos prometedores

Los 12 análogos peptídicos en total resultaron ser los más prometedores del proceso algorítmico de selección (Figura 1-3). Estas secuencias poseen propiedades fisicoquímicas idóneas, una buena actividad antimicrobiana y un bajo efecto hemolítico. En el análisis secuencial de los análogos, se emplearon los servidores HELIQUEST y PEPDRAW para verificar parámetros clave como la carga neta positiva, la hidrofobicidad y el punto isoeléctrico, atributos fundamentales que influyen en la capacidad de los péptidos para modular su actividad antibiótica (Zeletzsky & Tossi, 2006).

En comparación con el péptido original Lineatina-2, que tiene una cationicidad de +4 y una hidrofobicidad de 0,802, los análogos diseñados muestran mejoras significativas (Tabla 2-3). En la fase 1, el análogo 2A4A5A mantiene la misma carga, pero reduce su hidrofobicidad a 0,612. En la fase 2, los análogos 2A3K5A11K13A19K y 4A5A7R14A15K presentan una mayor cationicidad de (+6 y +7, respectivamente) y una hidrofobicidad más baja de (0,352 y 0,472), lo que resulta un mejor balance entre actividad antimicrobiana y menor toxicidad (Tabla 4-3 y 5-3).

Finalmente, los análogos CPPs diseñados, específicamente 3R5R6E13A17K21R y 1K3R6E7W8R13A17R21R, destacaron por presentar una mayor cationicidad (+8) y una menor hidrofobicidad (0,352 y 0,435, respectivamente) con respecto al péptido original. Esta combinación equilibrada de propiedades contribuyó a una buena predicción de CPPs, lo que sugiere que el diseño racional de estos péptidos puede optimizar su capacidad para penetrar células (Tabla 2-3 y 3-3).

Los análogos mantienen una cationicidad inferior a +9 en cada proceso, límite establecido para preservar su especificidad hacia las membranas microbianas y evitar una mayor afinidad por las células del huésped (Porto et al., 2012). Este límite se fundamenta en la interacción electrostática entre los péptidos antimicrobianos y las membranas bacterianas, las cuales son predominantemente aniónicas debido a componentes como ácidos teicoicos en las bacterias Gram positivas y lipopolisacáridos en las Gram negativas (Melo, Ferre, & Castanho, 2009). Esta carga negativa permite que

los AMPs catiónicos interactúan mediante atracciones electrostáticas, facilitando así su acción antimicrobiana (Zasloff, 2002; Huang et al., 2010). Sin embargo, si la cationicidad del péptido supera +9, puede aumentar la afinidad no solo por las membranas microbianas, sino también por las células del huésped, lo que puede resultar en efectos adversos indeseados, como hemólisis o toxicidad celular (Matsuzaki, 2009). Además, un aumento excesivo de la carga catiónica tiende a deformar la estructura helicoidal del péptido debido a la repulsión electrostática entre los residuos cargados, lo que desestabiliza su disposición estructural y disminuye su actividad (Chen et al., 2005). Así mismo, los análogos prometedores presentan una hidrofobicidad inferior a la de Lineatina-2. Esta disminución en la hidrofobicidad se correlaciona con una reducción en el efecto hemolítico, lo que resalta su potencial microbiano (Kang et al., 2014).

Para identificar los análogos con mayor potencial de actividad antimicrobiana, se utilizaron tres herramientas computacionales (Tabla 4-3). CAMPR3 aplica algoritmos de aprendizaje automático para predecir la actividad antimicrobiana de nuevos péptidos, analizando parámetros como secuencia de aminoácidos, carga eléctrica e hidrofobicidad (Waghu & Idicula-Thomas, 2019). Se estableció un umbral de selección de $\geq 0,980$ para el primer cribado, garantizando que solo los análogos con alto potencial antibacteriano fueran considerados. Entre ellos, el análogo 4A5A obtuvo el puntaje más bajo aceptable (0,980), mientras que 1K3R6E7W8R13A17R21R alcanzó el valor más alto (0,996). Este riguroso criterio asegura que los péptidos seleccionados compartan características con compuestos antimicrobianos efectivos, minimizando el riesgo de escoger opciones ineficaces.

Por otro lado, AntiBP3 es una herramienta que predice la actividad antimicrobiana basándose en las características estructurales y bioquímicas de los péptidos, utilizando algoritmos de aprendizaje automático y datos experimentales (Bajiya et al., 2024). Para esta herramienta, se estableció un umbral de $\geq 0,80$, permitiendo mayor flexibilidad en comparación con CAMPR3. Todos los péptidos diseñados superaron este umbral, excepto los análogos 2A4A5A11K13A19K y 4A5A11K13A15K, que obtuvieron valores de 0,77 y 0,78, respectivamente. Aunque el umbral es más bajo, aún se seleccionaron compuestos con el potencial de ser efectivos, considerando que AntiBP3 también evalúa

propiedades bioquímicas adicionales que pueden influir en el desarrollo de AMPs.

Finalmente, AMPfun es otra herramienta *in silico* que predice la actividad antimicrobiana combinando datos experimentales con algoritmos computacionales, basándose en las características estructurales y funcionales de los péptidos (Pinacho-Castellanos et al., 2021). Para esta herramienta, se implementó un umbral de $\geq 0,920$, el cual fue superado por la mayoría de los análogos, siendo el análogo 3R5R6E13A17K21R con el valor más bajo (0,9246), pero aún dentro del rango establecido.

Pese a que, algunos análogos prometedores no obtienen el valor máximo de 1 en las herramientas predictivas, ciertos estudios evidencian que valores cercanos a este umbral aún pueden reflejar o no una actividad antimicrobiana significativa. Por ejemplo, en un estudio realizado por Galati y colaboradores en el 2022, diseñaron cinco fragmentos de un péptido antimicrobiano utilizando herramientas *in silico*. Sin embargo, ninguno de estos fragmentos mostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* en ensayos *in vitro*, a pesar de que las herramientas computacionales sugerían un potencial antimicrobiano (Galati, 2022). De manera similar, en una investigación de Chingaté López, se diseñaron análogos de péptidos antimicrobianos utilizando herramientas bioinformáticas, estos análogos mostraron una mejor estructura helicoidal y actividad antibacteriana en comparación con las secuencias nativas derivadas. Pese a ello, los ensayos *in vitro* revelaron que la actividad antimicrobiana de los análogos no coincidía con las predicciones computacionales (Chingaté López, 2012). Por lo tanto, se destacan la importancia de validar las predicciones *in silico* mediante ensayos experimentales, ya que las herramientas computacionales, aunque útiles, no siempre reflejan con precisión la actividad biológica real de los compuestos diseñados.

De la misma manera, se emplearon dos herramientas *in silico* para evaluar el potencial hemolítico de los análogos (Anexo A). HAPPENN, basado en redes neuronales, predice la hemólisis al analizar características estructurales y propiedades fisicoquímicas de péptidos conocidos (Timmons & Hewage, 2020). De modo que, se estableció un umbral

de $\leq 0,500$ para el segundo proceso de cribado, en la que todos los análogos prometedores obtuvieron valores bajos de hemólisis, destacando al análogo 2A4A5A11K13A19K (0,006) (Tabla 5-3). De esta forma, se descartaron aquellos análogos que tenían un umbral superior, ya que podrían causar daño a membranas de los glóbulos rojos (Raza & Arshad, 2020). Por ejemplo, el péptido lineatina-2, que presentó un valor predictivo de 0,978 según HAPPENN y en ensayos experimentales, mostró un efecto hemolítico (3%) en la concentración que presenta CMI y CMB, en contra de *E. coli* y *S. aureus* (Yambay, 2022). Además, DBAASP corroboró los resultados predichos por HAPPENN, clasificando los análogos prometedores como “no activos” contra eritrocitos, validando su potencial terapéutico (Pirtskhalava et al., 2021). Estos resultados coinciden con estudios previos como el de Bea y colaboradores en el 2017, que demostraron que la reducción de la hidrofobicidad disminuye la toxicidad sin afectar la actividad antimicrobiana (De la Salud Bea et al., 2017). Por lo tanto, la Tabla 4-3 y 5-3 demuestran que los análogos prometedores, además de tener una buena actividad antimicrobiana, también exhiben valores bajos de hemólisis al corroborarlos con varias herramientas *in silico*.

Con respecto a los análogos penetrantes en células, se utilizó el servidor CellPPD, el cual emplea múltiples características derivadas de la base de datos CPPsite y un algoritmo de clasificación basado en máquinas de soporte vectorial (SVM) para la predicción de péptidos penetrantes en células (Gautam et al., 2013; Gautam et al., 2015). Como resultado, se observa que los valores de predicción de actividad CPPs varían significativamente entre los diferentes péptidos diseñados (Tabla 3-3). De los 12 análogos generados, aquellos pertenecientes a la estrategia 2 presentaron los valores más altos de actividad CPPs, destacando a 1G3R6E7K7K12R y 1K3R6E7W8R13A17R21R, ambos con un valor de 0,34, clasificados como CPPs efectivos. Estos resultados están en concordancia con el enfoque de diseño presentado por Sharma et al. (2022), donde se resalta la importancia de optimizar propiedades fisicoquímicas como la carga positiva y el contenido de residuos Arg, Lys, Trp, Leu y Ala para mejorar la capacidad de penetración celular (Gautam et al., 2013; Souza et al., 2020; Desale et al., 2021).

Por otro lado, para evaluar la tendencia helicoidal de los análogos, se utilizó el servidor

PRABI, estableciendo un umbral $\geq$ al 50%, para el tercer proceso de cribado. Como resultado de este cribado, solo 12 análogos cumplieron con este criterio, lo que los identifica como los más prometedores (Tabla 2-3). Debido a que, una buena helicidad en los péptidos antimicrobianos permiten aumentar la actividad y mejora la capacidad del péptido para insertarse en la bicapa lipídica, los que favorece la formación de poros y permite la destrucción de la membrana bacteriana (CNRS-UCBL, 2021; Bahar & Ren, 2013).

Finalmente, se complementó la predicción tanto de la estructura secundaria con el uso del servidor JPred4 que emplea un algoritmo basado en múltiples alineamientos, generando un modelo de la estructura secundaria, indicando regiones helicoidales (Drozdetskiy et al., 2015). Esta herramienta permitió corroborar la estructura secundaria de los 12 análogos predicha antes por PRABI. De los cuales, la mayoría de los análogos mostraron predicciones consistentes con una buena formación helicoidal, lo que refuerza su potencial antimicrobiano. Sin embargo, los análogos 4A5A, 2A4A5A y 4A5A7R14A15K no cumplieron completamente con las expectativas en sus proyecciones helicoidales, lo que podría limitar su capacidad de interacción eficiente con las membranas bacterianas. En contraste, los demás análogos presentaron estructuras secundarias favorables, alineadas con el criterio helicoidal esperado, destacando su prometedor diseño para futuras evaluaciones experimentales (Figura 2-3 a).

Así mismo, se utilizó AlphaFold, una herramienta basada en inteligencia artificial desarrollada para la predicción de estructuras secundarias tridimensionales de péptidos con alta precisión. Su algoritmo utiliza redes neuronales profundas y un enfoque de modelado comparativo, incorporando información evolutiva, secuencias homólogas y datos experimentales disponibles para predecir estructuras con gran confiabilidad (Nussinov et al., 2022). Por lo cual se evaluaron los 12 análogos diseñados, obteniendo conformaciones helicoidales mejor definidas que las del péptido original (Figura 2-3 b). Este resultado refuerza la idea de que los análogos tienen una mayor estabilidad estructural y un diseño optimizado, lo que podría traducirse en un mejor desempeño en su actividad antimicrobiana y menor toxicidad.

4.4. Acoplamiento molecular

La interacción de los péptidos antimicrobianos (AMPs) con las membranas bacterianas es fundamental para entender su mecanismo de acción. La afinidad y la capacidad de estos péptidos para insertarse en las membranas determinan tanto su eficacia como su especificidad antimicrobiana (Fàbrega et al., 2016). Es por esto, que se realizó el acoplamiento molecular utilizando la herramienta Mgltools junto con el software Autodock Vina, ya que permite simular la interacción directa de los péptidos con las membranas bacterianas u otros componentes biológicos, a través de su algoritmo basado en el cálculo de energías de afinidad (Bechinger & Gorr, 2017). Esta herramienta ha sido utilizada en diferentes investigaciones de los AMPs (Rentzsch & Renard, 2015).

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, entre los 12 análogos prometedores y dos tipos de membranas: la membrana celular bacteriana (PDB: 2W6D) y la membrana Gram positiva, son significativos (Anexo F). En el caso de la membrana bacteriana, se destacaron los análogos que obtuvieron valores de afinidad energética más negativos, especialmente el análogo 1K3R6E7W8R13A17R21R, con -5,602 kcal/mol (Tabla 7-3). Sin embargo, las simulaciones mostraron que la interacción de los análogos ocurrió mayormente en la superficie de la bicapa lipídica de la membrana bacteriana, sin insertarse (Figura 3-3 a). Esto puede deberse a la composición lipídica, que refleja una posible similitud con membranas Gram negativas, como las de *E. coli*, donde la interacción del péptido con este tipo de membrana dificulta su inserción debido a que presenta una capa externa compleja, como los lipopolisacáridos (LPS), que aumentan la carga neta negativa hacia la membrana externa (Andreev et al., 2018; Sánchez et al., 2016).

Resultados semejantes fueron expuestos en la investigación realizada por Zasloff (2002), en la que sugiere que los péptidos antimicrobianos, como las defensinas, muestran una mayor afinidad por las membranas Gram positivas en comparación con las Gram negativas. Esto se atribuye a la estructura más simple de las membranas Gram positivas, que carecen de la compleja capa externa de lipopolisacáridos (LPS) que caracteriza a las Gram negativas (Zasloff, 2002). De manera similar, el estudio de Mahlapuu et al. (2016)

describe cómo los péptidos antimicrobianos diseñados pueden desestabilizar la membrana bacteriana sin necesidad de una inserción profunda, un comportamiento que podría estar relacionado con el mecanismo de "alfombra". Este mecanismo implica la formación de una capa superficial sobre la membrana, lo que altera su estructura lipídica, aumenta la permeabilidad y provoca la disrupción de la membrana, todo lo cual minimiza los efectos secundarios sobre las células humanas. (Mahlapuu et al., 2016).

Por otro lado, también se realizó el acoplamiento molecular entre los 12 análogos diseñados y la membrana Gram positiva (Anexo F), en la que se observa la inserción de los análogos en la membrana bacteriana positiva, dilucidando así, su mecanismo membranólítico (Figura 3-3 b). Destacando a los análogos 4A5A11K13A15K y 4A5A7R13A15K ambos de la segunda estrategia, con valores de afinidad energética de -7,09 kcal/mol y -7,018, respectivamente, superando a Lineatina-2 (-6,754 kcal/mol) (Tabla 8-3). Sin embargo, los demás análogos presentaron valores que indican una afinidad inferior en comparación con el péptido original. De manera que los análogos peptídicos comparten características estructurales e hidrofóbicas con otros péptidos antimicrobianos estudiados. Estas características son importantes en el mecanismo de acción, dado que, la membrana celular es el principal objetivo de los péptidos catiónicos (Hancock & Diamond, 2000). Por ejemplo, en las bacterias Gram positivas, su membrana no tiene capa externa o LPS, pero su estructura superficial está formada por peptidoglucano que es rico en ácidos teicoicos, cargados negativamente, por lo tanto, favorecen la carga negativa de la pared celular y la interacción con péptidos catiónicos (Sitaram & Nagaraj, 1999; Téllez & Castaño, 2010).

Los análogos diseñados en este estudio muestran una actividad antimicrobiana efectiva, sin inducir hemólisis. Sin embargo, para confirmar realmente que estos análogos peptídicos desestabilizan la membrana bacteriana, sería necesario llevar a cabo investigaciones adicionales. Por ejemplo, simulaciones de dinámica molecular que podrían proporcionar una comprensión más detallada del mecanismo de acción, permitiendo analizar en profundidad la interacción específica de los péptidos con las membranas bacterianas. Esto podría integrarse para conocer la interacción real de los péptidos en términos de tiempo y energía de minimización.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El diseño racional de nuevos agentes antimicrobianos tiene el potencial de superar los desafíos asociados con estas moléculas en su desarrollo como medicamentos, tales como la baja actividad y la alta toxicidad. Así mismo, este enfoque no solo permite descartar compuestos con propiedades no deseadas, sino que también ofrece soluciones innovadoras para abordar la creciente escasez de tratamientos efectivos contra infecciones causadas por una amplia variedad de bacterias. En este estudio, se diseñaron 230 análogos del péptido lineatina-2, mediante dos estrategias de modificación con el objetivo de incrementar la actividad antimicrobiana y reducir el efecto hemolítico utilizando herramientas bioinformáticas. A través de un proceso de cribado se identificaron 12 análogos prometedores con propiedades fisicoquímicas claves, incluyendo un incremento en la carga neta (+4 a +8), una reducción en la hidrofobicidad (0.802 a 0.352) y una mayor propensión a formar estructuras α -hélice. Estas características demostraron ser fundamentales para potenciar la actividad antimicrobiana y, al mismo tiempo, minimizar el efecto hemolítico. Además, los 12 análogos seleccionados fueron evaluados mediante interacciones con membranas bacterianas, lo que permitió identificar al análogo 1K3R6E7W8R13A17R21R con una interacción de -5,602 kcal/mol en la superficie de la membrana Gram negativa, mientras que el análogo 4A5A11K13A15K con una mayor afinidad energética de -7,09 kcal/mol, mostró la capacidad para penetrar la membrana Gram positiva. Este estudio *in silico* ha demostrado la viabilidad de diseñar análogos peptídicos con un potencial antimicrobiano significativo y un bajo efecto hemolítico. Los resultados obtenidos no solo respaldan la eficacia de los análogos diseñados frente al péptido original, sino que también proporcionan una base sólida para futuras investigaciones experimentales. Se recomienda realizar ensayos complementarios, como pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) y estudios de citotoxicidad, para validar estos hallazgos. Al igual, es importante realizar simulaciones de dinámica molecular a mayor escala, considerando tiempos de simulación extendidos y sistemas más complejos que incluyan múltiples péptidos interactuando simultáneamente con la membrana. Aunque esto implica un mayor costo computacional, pero permitiría comprender mejor su comportamiento en entornos biológicos y posibles mecanismos de acción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreev, K., Martynowycz, M. W., Huang, M. L., Kuzmenko, I., Bu, W., Kirshenbaum, K., & Gidalevitz, D. (2018). Hydrophobic interactions modulate antimicrobial peptoid selectivity towards anionic lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(6), 1414–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.021>
- Areiza, J. (2003). *Diseño y síntesis en fase sólida de peptidomiméticos con posible aplicación a la terapia de la enfermedad de Alzheimer* [Universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/191583>
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., & Miller, S. I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 122(3), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>
- Bahar, A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bajiya, N., Choudhury, S., Dhall, A., & Raghava, G. P. S. (2024). AntiBP3: A method for predicting antibacterial peptides against gram-positive/negative/variable bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13(2), 168. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020168>
- Barreto, A., Patarroyo, M. E., & Curtidor, H. (2019). Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 56(6), 351–373. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1631249>
- Bechinger, B., & Gorr, S.-U. (2017). Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Beltrán, J. (2019). *Métodos de selección óptima de descriptores moleculares para la clasificación de la actividad antimicrobiana y el diseño de nuevos péptidos* [Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2803>
- Bermúdez, S. (2021). *Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Cruzioseptina-1* [Universidad Regional Amazónica Ikiám]. http://repositorio.ikiám.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/572
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Cantillo, J., & Navarro, F. (2016). Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *Medigraphic*, 96–115
- Chan, L. Y., Zhang, V. M., Huang, Y.-H., Waters, N. C., Bansal, P. S., Craik, D. J., & Daly, N. L. (2013). Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: Influences on stability and bioactivity. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 14(5), 617–624.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201300034>

- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1398–1406. <https://doi.org/10.1128/aac.00925-06>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12316–12329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413406200>.
- Chingaté López, S. (2012). Diseño, síntesis y evaluación “in vitro” de análogos de péptidos antimicrobianos con potencial actividad como compuestos antituberculosos. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/75071>.
- Chung, C.-R., Kuo, T.-R., Wu, L.-C., Lee, T.-Y., & Horng, J.-T. (2019). Characterization and identification of antimicrobial peptides with different functional activities. *Briefings in Bioinformatics*, 21(3), 1098–1114. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz043>
- CNRS-UCBL. (2021). *NPS@ : BLAST homology search*. POLO BIOINFORMÁTICO PRABI-GERLAND RHONE-ALPES SITIO GERLAND Instituto de Biología y Química de Proteínas. https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_blast.html
- Conlon, J. M., & Mechkarska, M. (2014). Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 7(1), 58–77. <https://doi.org/10.3390/ph7010058>
- Copolovici, D. M., Langel, K., Eriste, E., & Langel, Ü. (2014). Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano*, 8(3), 1972–1994. <https://doi.org/10.1021/nn4057269>
- CRN-RAM-INSPI. (2018). *INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018*. Ministerio de Salud Publica. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Cuesta, S. A., Reinoso, C., Morales, F., Pilaquinga, F., Morán-Marcillo, G., Proaño-Bolaños, C., Blasco-Zúñiga, A., Rivera, M., & Meneses, L. (2021). Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. *Amino Acids*, 53(6), 853–868. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-02986-w>
- Cutrona, K. J., Kaufman, B. A., Figueroa, D. M., & Elmore, D. E. (2015). Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 589(24PartB), 3915–3920. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.002>
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02648-5)
- De Cena, G. L., Scavassa, B. V., & Conceição, K. (2022). In silico prediction of anti-infective and cell-penetrating peptides from *Thalassophryne nattereri* natterin toxins. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(9), 1141. <https://doi.org/10.3390/ph15091141>

- De la Salud Bea, R., Petraglia, A., Ascuitto, M., & Buck, Q. (2017). Antibacterial activity and toxicity of analogs of scorpion venom IsCT peptides. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 6(3), 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6030013>
- Desale, K., Kuche, K., & Jain, S. (2021). Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. *Biomaterials Science*, 9(4), 1153–1188. <https://doi.org/10.1039/d0bm01755h>
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- Du, Q., Hou, X., Ge, L., Li, R., Zhou, M., Wang, H., Wang, L., Wei, M., Chen, T., & Shaw, C. (2014). Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, *Androctonus crassicauda*, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10), 1097–1107. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9859>
- Eckert, R., Qi, F., Yarbrough, D. K., He, J., Anderson, M. H., & Shi, W. (2006). Adding selectivity to antimicrobial peptides: Rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1480–1488. <https://doi.org/10.1128/aac.50.4.1480-1488.2006>
- F., W., N., O., & L., O. (2012). Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides. In *Protein Structure*. InTech.
- Fàbrega, A., Ballesté-Delpierre, C., & Vila, J. (2016). Differential impact of ramRA mutations on both ramA transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 617–624. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv410>
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Freeman, T., & Badani, H. (2011). *PepDraw*. Universidad de Tulane. <https://pepdraw.com/>
- Galati, VL (2022). Actividad *in vitro* e *in silico* de cinco péptidos solapantes procedentes de un péptido antimicrobiano [Trabajo de fin de máster, Universidad de La Laguna]. Repositorio Institucional de la Universidad de La Laguna. <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/31698>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Juan M. Walker (ed). <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2015). Computer-aided virtual screening and designing of cell-penetrating peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1324, 59–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_4
- Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, A., Kapoor, P., Tyagi, A., Open source drug discovery consortium, & Raghava, G. P. S. (2013). *In silico* approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 74.

<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-74>

- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de Mexico*, 156(2), 172–180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Gottler, L. M., & Ramamoorthy, A. (2009). Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan — A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1788(8), 1680–1686. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.009>
- Guo, Y., Xun, M., & Han, J. (2018). A bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) and its analogs kill pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* by interacting with outer membrane protein A (OmpA). *Medicine*, 97(42), e12832. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000012832>
- Han, Y., Zhang, M., Lai, R., & Zhang, Z. (2021). Chemical modifications to increase the therapeutic potential of antimicrobial peptides. *Peptides*, 146(170666), 170666. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170666>
- Hancock, R. E., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402–410. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01823-0)
- Hicks, R. P., Bhonsle, J. B., Venugopal, D., Koser, B. W., & Magill, A. J. (2007). De Novo design of selective antibiotic peptides by incorporation of unnatural amino acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(13), 3026–3036. <https://doi.org/10.1021/jm061489v>
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1778(2), 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell*, 1(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/cmr.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383. <https://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Kang, SJ, Park, SJ, Mishig-Ochir, T., y Lee, BJ (2014). Péptidos antimicrobianos: potencial terapéutico. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12 (12), 1477–1486.

<https://doi.org/10.1586/14787210.2014.976613>

- León, R. (2021). *Reposicionamiento de fármacos como estrategia para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas* [Universidad de Sevilla]. <https://hdl.handle.net/11441/132921>
- Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013>
- Medina, A. (2022). *Caracterización de los perfiles de resistencia antimicrobiana de Escherichia coli aislada de mamíferos en cautiverio del EcoZoológico San Martín – Baños de Agua Santa*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36569/1/CBT%20015.pdf>
- Melo, M. N., Ferre, R., & Castanho, M. A. R. B. (2009). Antimicrobial peptides: Linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 245–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2095>
- Mwangi, J., Kunming Institute of Zoology Chinese Academy of Sciences, Kamau, P., Thuku, R., & Lai, R. (2023). Design methods for antimicrobial peptides with improved performance. *Zoological Research*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2023.246>
- Nussinov, R., Zhang, M., Liu, Y., & Jang, H. (2022). AlphaFold, artificial intelligence (AI), and allostery. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 126(34), 6372–6383. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c04346>
- OMS. (2023). *Resistencia a los antimicrobianos: acelerar las respuestas nacionales y mundiales. Prioridades estratégicas y operacionales de la OMS para hacer frente a las infecciones bacterianas farmacorresistentes en el sector de la salud humana, 2025-2035*. Organización Mundial de La Salud. https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB154/B154_13-sp.pdf
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. (2014). Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 28–45. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.013>
- Ortiz López, C.. (2019). Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 43(169), 614–627. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.864>
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers.

Protein Science: A Publication of the Protein Society, 30(1), 70–82.
<https://doi.org/10.1002/pro.3943>

- Pinacho-Castellanos, S. A., García-Jacas, C. R., Gilson, M. K., & Brizuela, C. A. (2021). Alignment-Free Antimicrobial Peptide Predictors: Improving Performance by a Thorough Analysis of the Largest Available Data Set. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, 61(6), 3141–3157.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00251>
- Pirtskhalava, M., Armstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- Porto, W. F., Silva, O. N., & Franco, O. L. (2012). Prediction and rational design of antimicrobial peptides. En E. Faraggi (Ed.), *Protein structure* (Cap. 17). InTech. <https://doi.org/10.5772/38023>
- Ramos, S., & Cornejo, M. (2024). *Efecto inhibitorio del péptido melitina sobre la actividad hidrolítica de β -lactamasas de espectro extendido de Escherichia coli* [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/16277>
- Raza, A., & Arshad, H. S. (2020). Prediction of Hemolysis Tendency of Peptides using a Reliable Evaluation Method. *arXiv* (Cornell University). <https://doi.org/10.48550/arxiv.2012.06470>
- Rentzsch, R., & Renard, B. Y. (2015). Docking small peptides remains a great challenge: An assessment using AutoDock Vina. *Briefings in Bioinformatics*, 16(6), 1045–1056.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbv008>
- Rollins-Smith, L. A. (2009). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1788(8), 1593–1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>
- Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5713.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
- Sachon, E., Walrant, A., Sagan, S., Cribier, S., & Rodriguez, N. (2021). Binding and crossing: Methods for the characterization of membrane-active peptides interactions with membranes at the molecular level. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 699(108751), 108751.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108751>
- Sánchez, Y., Camargo, O., & Orduz, S. (2016). Diseño de péptidos antimicrobianos derivados de dermaseptina S4 [Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín]. Repositorio Institucional UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55719>
- Santos, P., Muñoz, L., Cruz, C., Navarrete, J., & Pinilla, G. (2021). *Péptidos antimicrobianos LL-37 y sus derivados frente a microorganismos de importancia clínica: Una alternativa a la resistencia microbiana* (Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca-Colombia, Ed.). © Editorial Instituto Antioqueño de Investigación Medellín.
- Sharma, P., Sharma, S., Joshi, S., Barman, P., Bhatt, A., Maan, M., Singla, N., Rishi, P., Ali, M. E., Preet, S.,

- & Saini, A. (2022). Design, characterization and structure–function analysis of novel antimicrobial peptides based on the N-terminal CATH-2 fragment. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16303-2>
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., & Potempa, J. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4673–4679. <https://doi.org/10.1128/aac.48.12.4673-4679.2004>
- Sitaram, N., & Nagaraj, R. (1999). Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochimica et biophysica acta*, 1462(1-2), 29–54. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00199-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00199-6)
- Souza, P. F. N., Marques, L. S. M., Oliveira, J. T. A., Lima, P. G., Dias, L. P., Neto, N. A. S., Lopes, F. E. S., Sousa, J. S., Silva, A. F. B., Caneiro, R. F., Lopes, J. L. S., Ramos, M. V., & Freitas, C. D. T. (2020). Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie*, 175, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236-1241. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.023>
- Téllez, Germán Alberto, & Castaño, Jhon Carlos. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67. Retrieved January 27, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922010000100007&lng=en&tlng=es.
- Timmons, P. B., & Hewage, C. M. (2020). HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Scientific Reports*, 10(1), 10869. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67701-3>
- Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), 4–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)
- Troeira, S., Quintas, A., Bagatolli, L. A., Homblé, F., & Castanho, M. A. R. B. (2007). Energy-independent translocation of cell-penetrating peptides occurs without formation of pores. A biophysical study with pep-1. *Molecular Membrane Biology*, 24(4), 282–293. <https://doi.org/10.1080/09687860601142936>
- Uggerhøj, L. E., Poulsen, T. J., Munk, J. K., Fredborg, M., Sondergaard, T. E., Frimodt-Møller, N., Hansen, P. R., & Wimmer, R. (2015). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: Do's and don'ts. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 16(2), 242–253. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402581>
- Usmani, S. S., Kumar, R., Bhalla, S., Kumar, V., & Raghava, G. P. S. (2018). *In silico* tools and databases for designing peptide-based vaccine and drugs. *Advances in Protein Chemistry and Structural*

- Biology, 112, 221–263. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.01.006>
- Vargas, M., & Andrade, J. (2018). *Prevalencia de resistencia al uso de antimicrobianos en infección del tracto urinario de pacientes hospitalizados en el servicio de medicina interna del hospital “José María Velasco Ibarra” de la ciudad del Tena periodo 2014 -2017*. Universidad Nacional de Chimborazo. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/4978>
- Vélez, A., Mera, C., Orduz, S., & Branch, J. (2021). *Generación de péptidos antimicrobianos mediante redes neuronales recurrentes*. Dyna (Medellín, Colombia). <http://doi.org/10.15446/dyna.v88n221.88799>
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P., & Idicula-Thomas, S. (2016). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1094-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>
- Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2019). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*, 29(1), 36-42. <https://doi.org/10.1002/pro.3714>
- Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2020). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 29(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/pro.3714>
- Xu, X., & Lai, R. (2015). The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*, 115(4), 1760–1846. <https://doi.org/10.1021/cr4006704>
- Yakubovitch, A. V., Solov'yov, I. A., Solov'yov, A. V., & Greiner, W. (2004). Conformational properties of neutral and charged alanine and glycine chains. arXiv. <https://arxiv.org/abs/physics/0406093>
- Yambay, E. (2022). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE LITHODYTES LINEATUS (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)* [Universidad Regional Amazónica Ikiam]. http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/704
- Yin, L. M., Edwards, M. A., Li, J., Yip, C. M., & Deber, C. M. (2012). Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7738–7745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303602>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1436–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.021>

ANEXOS

Anexo A: Herramientas *in silico*

Categoría	Herramientas <i>in silico</i>	Algoritmo ^a	Porcentaje de precisión	Especificidad	Sensibilidad
Propiedades Físicoquímicas	PepDraw	Algoritmo determinístico basado en fórmulas bioquímicas	100% (calculado)	Alta	Alta
	HeliQuest	Reglas de hélice anfipática	100% (calculado)	Alta	Alta
Actividad antimicrobiana	CAMPR3	SVM, RF, LDA	89.3%	Alta	Alta
	AntiBP3	SVM, ANN	85.5%	Moderada	Alta
	AMPfun	SVM, ANN	87%	Moderada	Alta
Hemólisis	DBAASP	ANN, RF	91%	Alta	Alta
	HAPPENN	SVM, ANN, RF	85.66%	Alta	Alta
Predicción de péptidos CPP	CelIPPD	SVM	90%	Alta	Alta
Porcentaje de helicidad	PRABI	ANN	90%	Alta	Alta
Estructura secundaria	Jpred4	ANN	82%	Alta	Alta
Estructura secundaria en 3D	AlphaFold	DL	90%	Alta	Alta

^a Support Vector Machines (SVM), Random Forest (RF) y Discriminante Lineal (LDA), Artificial Neural Network (ANN), Deep Learning (Redes Neuronales Profundas).

Biblioteca de análogos

Estrategia 1

Cara Polar

Anexo B: Análogos generados aumentando la cationicidad.

Aumento de la cationicidad									
N°	Nombre	Secuencia	AB			AH		C^f	HD^f
			$C3^a$	BP^b	FN^c	$HAPN^d$	$DBAP^e$		
0	Lineatina-2	ILPLLITAAKVIPKIH S FFK N L	0.973	0.81	0.9257	A/0.64	0.978	3	0.802
1	T7K	ILPLLI K AAKVIPKIH S FFK N L	0.977	0.9	0.9486	A/0.55	0.949	4	0.745
2	S17K	ILPLLITAAKVIPKIH K FFK N L	0.984	0.84	0.9457	A/0.67	0.981	4	0.759
3	N21K	ILPLLITAAKVIPKIH S FFK K L	0.983	0.88	0.9591	A/0.68	0.972	4	0.784
4	T7K/S17K	ILPLLI K AAKVIPKIH K FFK N L	0.984	0.92	0.957	A/0.58	0.958	5	0.702
5	T7K/N21K	ILPLLI K AAKVIPKIH S FFK K L	0.985	0.94	0.9661	A/0.59	0.936	5	0.727
6	S17K/N21K	ILPLLITAAKVIPKIH K FFK K L	0.990	0.91	0.9591	A/0.65	0.960	5	0.741
7	T7K/S17K/N21K	ILPLLI K AAKVIPKIH K FFK K L	0.990	0.95	0.9661	A/0.62	0.920	6	0.684
8	T7R	ILPLLI R AAKVIPKIH S FFK N L	0.957	0.85	0.9379	A/0.63	0.928	4	0.744
9	S17R	ILPLLITAAKVIPKIH R FFK N L	0.963	0.83	0.95	A/0.69	0.976	4	0.758
10	N21R	ILPLLITAAKVIPKIH S FFK R L	0.955	0.84	0.9551	A/0.71	0.975	4	0.783
11	T7R/S17R	ILPLLI R AAKVIPKIH R FFK N L	0.967	0.87	0.9603	A/0.61	0.935	5	0.700
12	T7R/N21R	ILPLLI R AAKVIPKIH S FFK R L	0.954	0.88	0.9554	A/0.57	0.932	5	0.725
13	S17R/N21R	ILPLLITAAKVIPKIH R FFK R L	0.956	0.86	0.9591	A/0.64	0.957	5	0.739
14	T7R/S17R/N21R	ILPLLI R AAKVIPKIH R FFK R L	0.976	0.89	0.9694	A/0.53	0.887	6	0.681
15	T7H	ILPLLI H AAKVIPKIH S FFK N L	0.957	0.85	0.937	NoA/0.52	0.905	3	0.796
16	S17H	ILPLLITAAKVIPKIH H FFK N L	0.963	0.81	0.9507	A/0.65	0.984	3	0.810
17	N21H	ILPLLITAAKVIPKIH S FFK H L	0.972	0.82	0.966	A/0.64	0.946	3	0.835
18	T7H/S17H	ILPLLI H AAKVIPKIH H FFK N L	0.945	0.86	0.9586	A/0.54	0.939	3	0.804
19	T7H/N21H	ILPLLI H AAKVIPKIH S FFK H L	0.955	0.87	0.9697	A/0.52	0.775	3	0.829
20	S17H/N21H	ILPLLITAAKVIPKIH H FFK H L	0.964	0.83	0.9677	A/0.69	0.957	3	0.843
21	T7H/S17H/N21H	ILPLLI H AAKVIPKIH H FFK H L	0.946	0.87	0.9747	A/0.52	0.839	3	0.837
22	T7K/S17R	ILPLLI K AAKVIPKIH R FFK N L	0.975	0.91	0.957	A/0.61	0.950	5	0.701
23	T7K/N21R	ILPLLI K AAKVIPKIH S FFK R L	0.971	0.92	0.9621	A/0.59	0.947	5	0.726
24	S17K/N21R	ILPLLITAAKVIPKIH K FFK R L	0.977	0.87	0.9591	A/0.68	0.963	5	0.740
25	T7K/S17R/N21R	ILPLLI K AAKVIPKIH R FFK R L	0.979	0.92	0.9661	A/0.54	0.914	6	0.682
26	T7R/S17K	ILPLLI R AAKVIPKIH K FFK N L	0.975	0.88	0.9603	A/0.62	0.940	5	0.701
27	T7R/N21K	ILPLLI R AAKVIPKIH S FFK K L	0.971	0.91	0.9554	A/0.6	0.933	5	0.726

28	S17R/N21K	ILPLLITAAKVIPKIH RFFK KL	0.977	0.89	0.9591	A/0.68	0.963	5	0.740
29	T7R/S17K/N21K	ILPLL I RAAKVIPKIH KFFK KL	0.984	0.93	0.9694	A/0.59	0.915	6	0.683
30	T7R/S17H/N21K	ILPLL I RAAKVIPKIH HFFK KL	0.966	0.91	0.9644	A/0.64	0.957	5	0.734
31	T7K/S17H	ILPLL I KAACVIPKIH HFFK NL	0.969	0.9	0.9736	A/0.54	0.967	4	0.753
32	T7K/N21H	ILPLL I KAACVIPKIH SFFK HL	0.973	0.91	0.9755	A/0.53	0.883	4	0.778
33	S17K/N21H	ILPLLITAAKVIPKIH KFFK HL	0.982	0.85	0.976	A/0.65	0.949	4	0.792
34	T7K/S17H/N21H	ILPLL I KAACVIPKIH HFFK HL	0.966	0.91	0.9805	A/0.55	0.916	4	0.786
35	T7H/S17K/N21R	ILPLL I HAACVIPKIH KFFK RL	0.967	0.9	0.9607	A/0.62	0.863	5	0.734
36	T7R/S17R/N21K	ILPLL I RAAKVIPKIH RFFK KL	0.979	0.92	0.9694	A/0.57	0.906	6	0.682
37	T7R/S17H	ILPLL I RAAKVIPKIH HFFK NL	0.946	0.86	0.9669	A/0.61	0.953	4	0.752
38	T7R/N21H	ILPLL I RAAKVIPKIH SFFK HL	0.949	0.86	0.9648	A/0.64	0.876	4	0.777
39	S17R/N21H	ILPLLITAAKVIPKIH RFFK HL	0.959	0.84	0.976	A/0.68	0.953	4	0.791
40	T7R/S17H/N21H	ILPLL I RAAKVIPKIH HFFK HL	0.939	0.87	0.9738	A/0.59	0.909	4	0.785
41	I1K	K LPLLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.920	0.78	0.9213	NoA/0.54	0.912	4	0.675
42	L2K	I KPLLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.949	0.79	0.9123	A/0.59	0.840	4	0.680
43	L4K	IL P KLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.965	0.83	0.9416	A/0.55	0.899	4	0.680
44	L5K	IL P LKITAAKVIPKIH SFFK NL	0.967	0.86	0.9373	A/0.56	0.91	4	0.680
45	I6K	ILPLL K TAAKVIPKIH SFFK NL	0.971	0.82	0.9306	A/0.64	0.742	4	0.675
46	V11K	ILPLLITAA K IPKIH SFFK NL	0.982	0.81	0.9387	A/0.54	0.869	4	0.701
47	I12K	ILPLLITAA K VPKIH SFFK NL	0.968	0.81	0.9387	NoA/0.5	0.781	4	0.675
48	I15K	ILPLLITAAKVIP K H SFFK NL	0.981	0.81	0.9448	NoA/0.52	0.888	4	0.675
49	F18K	ILPLLITAAKVIPKIH S K FKNL	0.978	0.87	0.952	A/0.64	0.651	4	0.675
50	F19K	ILPLLITAAKVIPKIH S F KKNL	0.983	0.9	0.942	A/0.51	0.929	4	0.675
51	L22K	ILPLLITAAKVIPKIH SFFK N K	0.965	0.83	0.9287	A/0.66	0.953	4	0.68
52	I1R	R LPLLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.896	0.77	0.9236	A/0.53	0.884	4	0.674
53	L2R	I RPLLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.921	0.72	0.9191	A/0.64	0.88	4	0.679
54	L4R	IL P RLITAAKVIPKIH SFFK NL	0.940	0.84	0.9416	A/0.57	0.845	4	0.679
55	L5R	IL P LRITAAKVIPKIH SFFK NL	0.941	0.8	0.9476	A/0.57	0.901	4	0.679
56	I6R	ILPLL R TAAKVIPKIH SFFK NL	0.945	0.77	0.9376	A/0.66	0.843	4	0.674
57	V11R	ILPLLITAA R IPKIH SFFK NL	0.958	0.81	0.9347	A/0.57	0.85	4	0.700
58	I12R	ILPLLITAA V RPKIH SFFK NL	0.915	0.81	0.928	A/0.53	0.831	4	0.674
59	I15R	ILPLLITAAKVIP K R H SFFKNL	0.953	0.75	0.9208	A/0.51	0.873	4	0.674

60	F18R	ILPLLITAAKVIPKIH S RFKNL	0.946	0.85	0.936	A/0.67	0.681	4	0.675
61	F19R	ILPLLITAAKVIPKIH S RFKNL	0.959	0.87	0.928	A/0.55	0.923	4	0.675
62	L22R	ILPLLITAAKVIPKIH S FFKN R	0.914	0.81	0.9247	A/0.67	0.88	4	0.679
63	I1H	H LPLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.831	0.67	0.919	NoA/0.56	0.828	3	0.726
64	L2H	I HPLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.933	0.64	0.9212	A/0.61	0.72	3	0.730
65	L4H	IL P HLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.943	0.78	0.9348	NoA/0.54	0.693	3	0.730
66	L5H	IL P LHITAAKVIPKIH S FFKNL	0.945	0.72	0.9448	NoA/0.55	0.342	3	0.730
67	I6H	ILPLL H TAAKVIPKIH S FFKNL	0.945	0.77	0.9323	A/0.57	0.731	3	0.726
68	V11H	ILPLLITAA K HIPKIH S FFKNL	0.965	0.81	0.9487	A/0.57	0.979	3	0.752
69	I12H	ILPLLITAA V HPKIH S FFKNL	0.957	0.81	0.9387	NoA /0.5	0.92	3	0.726
70	I15H	ILPLLITAAKVIP K H S FFKNL	0.959	0.7	0.9548	NoA/0.53	0.737	3	0.726
71	F18H	ILPLLITAAKVIPKIH S H FKNL	0.964	0.79	0.952	A/0.65	0.784	3	0.726
72	F19H	ILPLLITAAKVIPKIH S H KNL	0.966	0.83	0.942	A/0.55	0.905	3	0.726
73	L22H	ILPLLITAAKVIPKIH S FFKN H	0.963	0.82	0.9235	A/0.65	0.925	3	0.730
74	I1K/L2K	K KPLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.788	0.76	0.9575	NoA/0.69	0.244	5	0.553
75	L4K/L5K	IL P K KITAAKVIPKIH S FFKNL	0.962	0.88	0.9391	NoA/ 0.78	0.123	5	0.557
76	I6K/V11K	ILPLL K TAA K IPKIH S FFKNL	0.975	0.82	0.9363	NoA/0.55	0.094	5	0.575
77	I12K/I15K	ILPLLITAA V K P K H S FFKNL	0.977	0.81	0.9487	NoA/0.73	0.303	5	0.548
78	F18K/F19K/L22K	ILPLLITAAKVIPKIH S K KKN K	0.978	0.95	0.9407	NoA/0.7	0.276	6	0.427
79	I1R/L2R	R RPLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.771	0.7	0.96	NoA/0.73	0.480	5	0.551
80	L4R/L5R	IL P R RITAAKVIPKIH S FFKNL	0.911	0.83	0.9416	NoA/0.59	0.152	5	0.555
81	I6R/V11R	ILPLL R TAA R IPKIH S FFKNL	0.925	0.77	0.939	NoA/0.65	0.214	5	0.573
82	I12R/I15R	ILPLLITAA V R P K R H SFFKNL	0.866	0.75	0.928	NoA/0.57	0.382	5	0.546
83	F18R/F19R/L22R	ILPLLITAAKVIPKIH S R RKN R	0.826	0.91	0.9313	A/0.51	0.445	6	0.424
84	I1H/L2H	H HPLLITAAKVIPKIH S FFKNL	0.562	0.47	0.9305	NoA/0.57	0.179	3	0.655
85	L4H/L5H	IL P H HITAAKVIPKIH S FFKNL	0.912	0.69	0.9491	NoA/0.61	0.067	3	0.659
86	I6H/V11H	ILPLL H TAA K HIPKIH S FFKNL	0.921	0.77	0.9462	A/0.59	0.745	3	0.676
87	I12H/I15H	ILPLLITAA V H P K H H SFFKNL	0.927	0.7	0.9587	NoA/0.53	0.472	3	0.650
88	F18H/F19H/L22H	ILPLLITAAKVIPKIH S H HKN H	0.922	0.84	0.9533	NoA/0.72	0.344	3	0.580
89	I1K/L2K/V11R/I12H	K KPLLITAA R H P KIH S FFKNL	0.781	0.76	0.9755	NoA/0.94	0.013	6	0.375
90	L4R/L5R/H16R/L22K	IL P R RITAAKVIP K I R SFFKN K	0.855	0.9	0.9387	NoA/0.92	0.058	7	0.381
91	V11K/I15K	ILPLLITAA K IP K K H SFFKNL	0.985	0.81	0.9487	NoA/0.66	0.628	5	0.575

92	V11K/F19K	ILPLLITAAKKIPKHSFFKKNL	0.986	0.90	0.955	NoA/0.64	0.429	5	0.575
93	I15K/F19K	ILPLLITAAKVIPKKHSFFKKNL	0.984	0.89	0.9511	NoA/0.69	0.574	5	0.549
94	I15K/F18K	ILPLLITAAKVIPKKHSFFKKNL	0.981	0.88	0.9611	NoA/0.67	0.214	5	0.549
95	V11K/I15K/F19K	ILPLLITAAKKIPKHSFFKKNL	0.985	0.89	0.955	NoA/0.78	0.232	6	0.448
96	P3K/V11K/I15K/F19K	ILKLLITAAKKIPKKHSFFKKNL	0.984	0.93	0.955	NoA/0.80	0.628	7	0.37

Probabilidad de ser antimicrobiano (AB) generada por:

^aCAMPR3

^bAntiBP3

^cAMPfun

Probabilidad de inducir hemólisis (HM) producida por:

^d HAPENN

^e DBAASP

^f Carga (C) e hidrofobicidad (HD) obtenidas en HeliQuest.

Cara No Polar

Anexo C: Análogos generados por modulación de hidrofobicidad

Modulación de la hidrofobicidad									
N°	Nombre	Secuencia	AB			AH		C ^f	HD ^f
			C3 ^a	BP ^b	FN ^c	HAPN ^d	DBAP ^e		
0	Lineatina-2	ILPLLITAAKVIPKHSFFKKNL	0.973	0.81	0.9257	0.978	A/0.64	3	0.802
1	L2A	IAPLLITAAKVIPKHSFFKKNL	0.977	0.64	0.9312	0.948	A/0.63	3	0.739
2	L4A	ILPALITAAKVIPKHSFFKKNL	0.977	0.75	0.9298	0.942	NoA/0.51	3	0.739
3	L5A	ILPLAITAAKVIPKHSFFKKNL	0.977	0.83	0.9356	0.845	NoA/0.51	3	0.739
4	L22A	ILPLLITAAKVIPKHSFFKNA	0.977	0.76	0.9148	0.925	A/0.64	3	0.739
5	L2A/L22A	IAPLLITAAKVIPKHSFFKNA	0.980	0.58	0.9193	0.817	A/0.63	3	0.675
6	L4A/L5A	ILPAAITAAKVIPKHSFFKKNL	0.980	0.77	0.9341	0.250	NoA/0.58	3	0.675
7	L2A/L5A/L22A	IAPLAITAAKVIPKHSFFKNA	0.982	0.65	0.9178	0.186	A/0.51	3	0.612
8	I1A	ALPLLITAAKVIPKHSFFKKNL	0.974	0.72	0.9446	0.966	A/0.61	3	0.734
9	I6A	ILPLLATAAKVIPKHSFFKKNL	0.975	0.78	0.9168	0.936	NoA/0.5	3	0.734
10	V11A	ILPLLITAAKAIPKHSFFKKNL	0.979	0.81	0.9387	0.969	A/0.64	3	0.760
11	I12A	ILPLLITAAKVAPKHSFFKKNL	0.975	0.81	0.9287	0.955	A/0.64	3	0.734
12	I15A	ILPLLITAAKVIPAHSFFKKNL	0.975	0.74	0.9348	0.972	A/0.65	3	0.734
13	I1A/I6A	ALPLLATAAKVIPKHSFFKKNL	0.975	0.68	0.9395	0.897	NoA/0.57	3	0.666
14	I12A/I15A	ILPLLITAAKVAPKAHSFFKKNL	0.975	0.74	0.9387	0.938	A/0.6	3	0.666

15	I1A/I12A/I15A	ALPLLITAAKVAPKAHSFFKN L	0.974	0.64	0.9417	0.906	NoA/0.53	3	0.599
16	I2S/L22S	ISPLLITAAKVIPKHSFFKNS	0.967	0.57	0.8947	0.571	A/0.68	3	0.644
17	L4T/I15T	ILPTLITAAKVIPKTHSFFKNL	0.957	0.67	0.9273	0.211	NoA/0.69	3	0.666
18	L5S/I12T	ILPLSITAAKVTPKHSFFKNL	0.957	0.75	0.9612	0.55	NoA/0.72	3	0.653
19	I1S/L4Q	SLPQLITAAKVIPKHSFFKNL	0.902	0.49	0.9329	0.539	NoA/0.64	3	0.631
20	L2S/V11T/F19Q	ISPLLITAAKTIPKHSFQKNL	0.941	0.59	0.9311	0.136	NoA/0.53	3	0.588
21	L2A/L4A	IAPALITAAKVIPKHSFFKNL	0.980	0.56	0.9188	0.681	NoA/0.59	3	0.675
22	L2A/L5A	IAPLITAAKVIPKHSFFKNL	0.980	0.71	0.9363	0.531	NoA/0.57	3	0.675
23	L4A/L22A	ILPALITAAKVIPKHSFFKNA	0.980	0.7	0.9243	0.814	NoA/0.54	3	0.675
24	L5A/L22A	ILPLAITAAKVIPKHSFFKNA	0.980	0.79	0.9169	0.569	NoA/0.52	3	0.675
25	L2A/L4A/L5A	IAPAAITAAKVIPKHSFFKNL	0.982	0.61	0.9233	0.034	NoA/0.57	3	0.612
26	L2A/L4A/L22A	IAPALITAAKVIPKHSFFKNA	0.982	0.51	0.9135	0.285	NoA/0.5	3	0.612
27	L4A/L5A/L22A	ILPAAITAAKVIPKHSFFKNA	0.982	0.72	0.9198	0.1	A/0.51	3	0.612
28	L2A/L4A/L5A/L22 A	IAPAAITAAKVIPKHSFFKNA	0.982	0.56	0.9237	0.017	A/0.53	3	0.549
29	I1A/V11A/L22A	ALPLLITAAKAIPKHSFFKNA	0.980	0.66	0.9304	0.845	A/0.56	3	0.630
30	A8L	ILPLLITLAKVIPKHSFFKNL	0.967	0.83	0.9115	0.989	A/0.7	3	0.865
31	A9L	ILPLLITALKVIPKHSFFKNL	0.967	0.81	0.9257	0.985	A/0.69	3	0.865
32	A8L/A9L	ILPLLITLLKVIPKHSFFKNL	0.957	0.83	0.9162	0.993	A/0.71	3	0.928
33	S17F	ILPLLITAAKVIPKIHFFFKNL	0.968	0.81	0.9407	0.989	A/0.61	3	0.885
34	S17V	ILPLLITAAKVIPKIHVFFKNL	0.969	0.79	0.9457	0.98	A/0.57	3	0.859
35	S17L	ILPLLITAAKVIPKIHFFFKNL	0.971	0.8	0.9457	0.986	A/0.58	3	0.881
36	S17I	ILPLLITAAKVIPKIHIFFKNL	0.972	0.79	0.9457	0.984	A/0.57	3	0.885
37	T7I	ILPLLIITAAKVIPKHSFFKNL	0.974	0.85	0.9181	0.986	A/0.73	3	0.872
38	T7V	ILPLLIITAAKVIPKHSFFKNL	0.972	0.85	0.917	0.984	A/0.74	3	0.845
39	T7L	ILPLLIITAAKVIPKHSFFKNL	0.973	0.86	0.912	0.977	A/0.73	3	0.867
40	T7F	ILPLLIITAAKVIPKHSFFKNL	0.962	0.83	0.937	0.988	A/0.73	3	0.871
41	N21V	ILPLLITAAKVIPKHSFFKVL	0.974	0.76	0.956	0.988	NoA/0.52	3	0.885
42	N21F	ILPLLITAAKVIPKHSFFKFL	0.974	0.77	0.966	0.989	A/0.52	3	0.910
43	N21L	ILPLLITAAKVIPKHSFFKLL	0.976	0.84	0.956	0.983	NoA/0.51	3	0.906
44	N21I	ILPLLITAAKVIPKHSFFKIL	0.976	0.8	0.966	0.989	NoA/0.54	3	0.911
45	S17F/T7I/N21V	ILPLLIITAAKVIPKIHFFFKVL	0.949	0.82	0.958	0.993	A/0.56	3	1.038

46	S17L/T7L/N21L	ILPLLILAAKVIPKIHFFKLL	0.953	0.91	0.9495	0.988	A/0.55	3	1.051
47	S17I/T7V/N21F	ILPLLIVAAKVIPKIHFFKFL	0.949	0.8	0.963	0.991	A/0.55	3	1.038
48	S17V/T7F/N21I	ILPLLIFAAKVIPKIHVFFKIL	0.927	0.81	0.973	0.995	A/0.56	3	1.038
49	S17V/T7V/N21V	ILPLLIVAAKVIPKIHVFFKVL	0.944	0.82	0.9569	0.991	A/0.56	3	0.985

Probabilidad de ser antimicrobiano (AB) generada por:

^aCAMPR3

^bAntiBP3

^cAMPfun

Probabilidad de inducir hemólisis (HM) producida por:

Estrategia 2

Ambas Caras

Anexo D: Análogos generados al modificar ambas caras

Modulación en ambas caras									
Nº	Nombre	Secuencia	AB			AH		C ^F	HD ^F
			C3 ^a	BP ^b	FN ^c	HAPN ^d	DBAP ^e		
0	Lineatina-2	ILPLLITAAKVIPKIHFFKNL	0.973	0.81	0.9257	0.978	A/0.64	3	0.802
1	LA5A11K13A15K	ILPAAITAAKKIAKKHSFFKNL	0.988	0.88	0.968	0.048	NoA/0.64	5	0.430
2	2A4A5A11K13A19K	IAPAAITAAKKIAKHSFFKNL	0.987	0.87	0.965	0.006	NoA/0.68	5	0.367
3	4A11K13A19K	ILPALITAAKKIAKHSFFKNL	0.990	0.87	0.965	0.415	NoA/0.56	5	0.493
4	2A3K5A11K13A19K	IAKLITAAKKIAKHSFFKNL	0.990	0.93	0.9558	0.147	NoA/0.61	6	0.352
5	4A5A11K13A	ILPAAITAAKKIAKHSFFKNL	0.989	0.97	0.968	0.106	NoA/0.57	4	0.556
6	4A5A6R13A15K	ILPAAIRAAKVIAKKHSFFKNL	0.990	0.83	0.9605	0.072	No/0.59	5	0.472
7	2A13A17K	IAPLLITAAKVIAKHKFFKNA	0.990	0.67	0.9721	0.965	A/0.68	4	0.614
8	2A13A17K22K	IAPLLITAAKVIAKHKFFKKA	0.994	0.81	0.9642	0.904	A/.650	5	0.596
9	2A7K13A17K	IAPLLIKAAKVIAKHKFFKNA	0.988	0.84	0.9671	0.708	A/0.64	5	0.557
10	2A7K13A17K22K	IAPLLIKAAKVIAKHKFFKKA	0.993	0.91	0.9565	0.845	A/0.69	6	0.539

^d HAPPENN

^e DBAASP

^f Carga (C) e hidrofobicidad (HD) obtenidas en HeliQuest.

Probabilidad de ser antimicrobiano (AB) generada por:

^aCAMPR3

^bAntiBP3

^cAMPfun

Probabilidad de inducir hemólisis (HM) producida por:

^d HAPPENN

^e DBAASP

^f Carga (C) e hidrofobicidad (HD) obtenidas en HeliQuest.

Estrategia 3
Análogos CPP

Anexo E: Diseño de análogos CPP al modificar ambas caras

Análogos CPP										
Nº	Nombre	Secuencia	AB			AH		C^F	HD^F	CPPs ^g
			$C3^a$	BP^b	FN^c	$HAPN^d$	$DBAP^e$			
0	Lineatina-2	ILPLLITAAKVIPKHSFF KNL	0.97 3	0.81	0.925 7	0.978	A/0.64	3	0.80 2	-0.20
1	I1K	KLPLLITAAKVIPKHSF FKNL	0.92 0	0.78	0.921 3	0.912	NoA/0. 54	4	0.67 5	0.02
2	I1K/V11D	KLPLLITAAKDIPKHSF FKNL	0.81 2	0.78	0.915 4	0.643	NoA/0. 55	3	0.58 5	0.02
3	I1K/L2I	KIPLLITAAKDIPKHSF FKNL	0.82 4	0.72	0.922 1	0.266	NoA/0. 5	3	0.58 9	0.01
4	I1K/L2K	KKPLLITAAKDIPKHSF FKNL	0.61 4	0.76	0.941 7	0.035	NoA/0. 89	4	0.46 2	0.03
5	I1K/L2R	KRPLLITAAKDIPKHSF FKNL	0.55 8	0.7	0.946 7	0.059	NoA/0. 89	4	0.46 1	0.03
6	I1K/L2W	KWPLLITAAKDIPKHS FFKNL	0.73 5	0.76	0.933 6	0.923	NoA/0. 53	3	0.61 0	0.01
7	I1K/P3A	KLALLITAAKDIPKHSF FKNL	0.92 5	0.82	0.892 1	0.938	NoA/0. 59	3	0.56 6	0.01
8	I1K/P3I	KLILLITAAKDIPKHSFF KNL	0.93 1	0.79	0.899 1	0.932	NoA/0. 57	3	0.63 4	0.07
9	I1K/P3R/V11D	KLRLITAAKDIPKHSF FKNL	0.88 5	0.87	0.906 5	0.858	NoA/0. 57	4	0.50 6	0.09
10	I1K/P3W/V11D	KLWLLITAAKDIPKHS FFKNL	0.88 2	0.85	0.901 6	0.977	A/0.72	3	0.65 4	0.04
11	I1K/L4K/V11D	KLPKLITAAKDIPKHSF FKNL	0.80 1	0.8	0.922 8	0.042	NoA/0. 82	4	0.46 2	0.13
12	I1K/L4R/V11D	KLPRLITAAKDIPKHSF FKNL	0.74 2	0.83	0.906 7	0.027	NoA/0. 84	4	0.46 1	0.07
13	I1K/L4T/V11D	KLPTLITAAKDIPKHSF FKNL	0.72 2	0.69	0.921 9	0.013	NoA/0. 89	3	0.51 9	0.07
14	I1K/L4W/V11D	KLPWLITAAKDIPKHS FFKNL	0.73 5	0.79	0.917 5	0.149	A/0.53	3	0.61 0	0.06
15	I1K/L5N/V11D	KLPLNITAAKDIPKHSF FKNL	0.73	0.69	0.924 7	0.153	NoA/0. 79	3	0.48 0	0.06
16	I1K/L5R/V11D	KLPLRITAAKDIPKHSF FKNL	0.73	0.78	0.936 7	0.164	NoA/0. 8	4	0.46 1	0.16
17	I1K/L5W/V11D	KLPLWITAAKDIPKHS FFKNL	0.73 5	0.84	0.928 9	0.832	A/0.51	3	0.61	0.08

18	I1K/V11D/L22K	KLPLLITAAKDIPKHSF FKNK	0.76 2	0.82	0.887	0.324	NoA/0. 76	4	0.46 2	0.18
19	I1K/L22R	KLPLLITAAKVIPKHSF FKNR	0.86 4	0.79	0.915 7	0.535	NoA/0. 66	5	0.55 2	0.11
20	I1K/V11D/F19R	KLPLLITAAKDIPKHSF RKNL	0.75 8	0.86	0.911 9	0.076	NoA/0. 85	4	0.45 7	0.10
21	I1K/V11D/F21K	KLPLLITAAKDIPKHSF FKKL	0.87 6	0.86	0.934 3	0.651	NoA/0. 54	4	0.56 7	0.15
22	I1K/V11D/F18R	KLPLLITAAKDIPKHSR FKNL	0.74 4	0.84	0.939 1	0.029	NoA/0. 57	4	0.45 7	0.14
23	I1K/V11D/F19K	KLPLLITAAKDIPKHSF KKNL	0.81 7	0.89	0.907	0.069	NoA/0. 83	4	0.45 8	0.15
24	I1K/V11D/F18K	KLPLLITAAKDIPKHSK FKNL	0.81 1	0.87	0.923	0.036	NoA/0. 85	4	0.45 8	0.16
25	I1K/V11D/H16R	KLPLLITAAKDIPKIRSF FKNL	0.83 5	0.83	0.915 3	0.421	NoA/0. 57	4	0.53 3	0.16
26	I1K/A8W/V11D	KLPLLITWAKDIPKHS FFKNL	0.72 7	0.82	0.909 7	0.84	A/0.58	3	0.67 3	0.08
27	I1K/A8R/V11D	KLPLLITRAKDIPKHSF FKNL	0.73 8	0.8	0.920	0.101	NoA/0. 88	4	0.52 5	0.09
28	I1K/T7R/V11D	KLPLLIRAAKDIPKHSF FKNL	0.83 5	0.83	0.930	0.243	NoA/0. 71	4	0.52 7	0.11
29	I1R/T7R	RLPLLIRAAKVIPKHSF FKNL	0.91 8	0.82	0.946 7	0.713	NoA/0. 55	5	0.61 6	0.04
30	I1R/T7R/L22R	RLPLLIRAAKVIPKHSF FKNR	0.91 2	0.85	0.940	0.241	NoA/0. 73	6	0.49 3	0.14
31	I1R/P3R/T7R/L22R	RLRLLIRAAKVIPKHSF FKNR	0.98 1	0.91	0.915 5	0.35	NoA/0. 81	7	0.41 5	0.23
32	I1R/I6R/T7R/L22R	RLPLLIRRAAKVIPKHS FFKNR	0.93 2	0.84	0.943	0.018	NoA/0. 83	7	0.36 5	0.26
33	I1R/T7R/P13R/L22R	RLPLLIRAAKVIRKHSF FKNR	0.96 1	0.85	0.960 3	0.35	NoA/0. 82	7	0.41 5	0.20
34	I1R/T7R/H16R/L22R	RLPLLIRAAKVIPKIRSF FKNR	0.95 4	0.89	0.952 3	0.18	NoA/0. 83	7	0.44 1	0.29
35	I1R/T7R/F18R/L22R	RLPLLIRAAKVIPKHSR FKNR	0.90 2	0.87	0.967	0.056	NoA/0. 91	7	0.36 6	0.27
36	I1R/T7R/N21R/L22R	RLPLLIRAAKVIPKHSF FKRR	0.95 8	0.88	0.97	0.511	NoA/0. 83	7	0.47 5	0.28
37	I1R/L5R/P13R/L22R	RLPLRITAAKVIRKHSF FKNR	0.91	0.79	0.979 3	0.285	NoA/0. 8	7	0.34 9	0.22
38	I1R/P3R/P13R/L22R	RLRLLITAAKVIRKHSF FKNR	0.96 4	0.86	0.926 8	0.822	NoA/0. 79	7	0.39 4	0.19

39	I1R/P13R/F18R/L22R	RLPLLITAAKVIRKIH SKFKNR	0.84 1	0.87	0.956 1	0.172	NoA/0. 69	7	0.34 6	0.21
40	I1R/P13R/S17R/L22R	RLPLLITAAKVIRKIH RFKFKNR	0.96 2	0.82	0.970 1	0.423	NoA/0. 74	7	0.42 8	0.20
41	I1G/P3R/T7R/L22R	GLRLLIRAAKVIPKIH SFKFKNR	0.98 7	0.9	0.936 7	0.615	NoA/0. 54	6	0.46 0	0.25
42	I1R/L2R/P3R/T7R/L22R	RRRLLIRAAKVIPKIH SFKFKNR	0.98 0	0.9	0.93	0.121	NoA/0. 57	8	0.29 1	0.26
43	I1R/P3R/L5W/T7R/L22R	RLRLWIRAAKVIPKIH SFFKFKNR	0.98 4	0.93	0.933 2	0.224	NoA/0. 83	7	0.44 0	0.28
44	I1R/P3R/T7R/A8R/L22R	RLRLLIRRAKVIPKIH SFKFKNR	0.98 6	0.92	0.900 8	0.029	NoA/0. 85	8	0.35 5	0.33
45	I1R/P3G/T7R/N21R/L22R	RLGLLIRAAKVIPKIH SFKRR	0.98 6	0.9	0.98	0.702	NoA/0. 57	7	0.44 2	0.25
46	I1R/P3K/T7R/N21R/L22R	RLKLLIRAAKVIPKIH SFKRR	0.98 7	0.93	0.941 7	0.553	A/0.58	8	0.39 7	0.24
47	P3G/T7K/S17K/N21R	ILGLLIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 6	0.92	0.956 1	0.969	NoA/0. 88	6	0.65 0	0.11
48	I1F/P3G/T7K/S17K/N21R	FLGLLIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 5	0.93	0.987 5	0.968	NoA/0. 71	6	0.65 0	0.22
49	I1V/P3G/T7K/S17K/N21R	VLGLLIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 5	0.9	0.956 1	0.919	NoA/0. 55	6	0.62 4	0.13
50	P3I/T7K/S17K/N21R	ILILLIKAAKVIPKIH KFF KRL	0.99 4	0.91	0.952 7	0.975	NoA/0. 73	6	0.73 2	0.18
51	P3KT7K/S17K/N21R	ILKLLIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 5	0.95	0.942 7	0.949	NoA/0. 81	7	0.60 5	0.09
52	P3L/T7K/S17K/N21R	ILLLLIKAAKVIPKIH KFF KRL	0.99 5	0.93	0.937 7	0.972	NoA/0. 83	6	0.72 8	0.05
53	P3G/L5K/T7K/S17K/N21R	ILGLKIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 5	0.94	0.968 6	0.795	NoA/0. 82	7	0.52 8	0.18
54	P3G/L5S/T7K/S17K/N21R	ILGLSIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.98 7	0.9	0.966 1	0.782	NoA/0. 83	6	0.57 1	0.09
55	P3G/L5T/T7K/S17K/N21R	ILGLTIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.98 8	0.9	0.954 9	0.74	NoA/0. 91	6	0.58 5	0.11
56	P3G/I6E/T7K/S17K/N21R	ILGLLEKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.98 5	0.82	0.983 6	0.384	NoA/0. 83	5	0.54 0	0.08
57	P3G/I6D/T7K/S17K/N21R	ILGLLDKAAKVIPKIH KFFKRL	0.99 1	0.81	0.961 3	0.807	NoA/0. 8	5	0.53 4	0.06
58	P3G/L5I/T7K/S17K/N21R	ILGLIIKAAKVIPKIH KFF KRL	0.99 5	0.94	0.966 1	0.969	NoA/0. 79	6	0.65 5	0.08
50	P3G/L5V/T7K/S17K/N21R	ILGLVIKAAKVIPKIH KHF FKRL	0.99 4	0.92	0.955 7	0.944	NoA/0. 69	6	0.62 9	0.07

60	P3G/I6A/T7K/S17K/N21R	ILGLLAKAAKVIPKIHK FFKRL	0.99 6	0.9	0.946 8	0.901	NoA/0. 74	6	0.58 3	0.08
61	P3G/I6C/T7K/S17K/N21R	ILGLLCKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 0	0.89	0.956 1	0.829	A/0.61	6	0.63 9	0.08
62	P3G/L5D/T7K/S17K/N21R	ILGLDIKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 1	0.8	0.978 8	0.696	A/0.58	5	0.53 8	0.11
63	P3G/L5A/T7K/S17K/N21R	ILGLAIKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 6	0.93	0.966 8	0.883	A/0.63	6	0.58 7	0.15
64	P3G/T7K/A8L/S17K/N21R	ILGLLIKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 5	0.93	0.946 8	0.987	A/0.66	6	0.71 4	0.17
65	P3G/T7K/A8D/S17K/N21R	ILGLLIKDAKVIPKIHK FKRL	0.99 2	0.85	0.958 2	0.7000	A/0.68	5	0.60 1	0.06
66	P3G/T7W/S17K/N21R	ILGLLIWAAKVIPKIHK FFKRL	0.99 3	0.89	0.924 8	0.991	A/0.93	5	0.79 8	0.05
67	P3G/T7R/S17K/N21R	ILGLLIRAAKVIPKIHK FKRL	0.99 4	0.9	0.949 4	0.961	A/0.62	6	0.65	0.12
68	P3G/T7F/S17K/N21R	ILGLLIFAAKVIPKIHK FKRL	0.99 2	0.88	0.956 1	0.993	A/0.82	5	0.77 7	0.04
69	P3G/I6S/T7K/S17K/N21R	ILGLLSKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 1	0.87	0.966 1	0.86	A/0.55	6	0.56 7	0.10
70	P3G/I6K/T7K/S17K/N21R	ILGLLKAAKVIPKIHK FKRL	0.99 7	0.94	0.956 1	0.772	A/0.58	7	0.52 4	0.14
71	P3G/T7F/S17K/N21K	ILGLLIFAAKVIPKIHK FKKL	0.99 6	0.91	0.956 1	0.992	A/0.78	5	0.77 8	0.07
72	P3G/T7R/S17K/N21R	ILGLLIRAAKVIPKIHK FKRL	0.99 4	0.9	0.949 4	0.961	A/0.62	6	0.65	0.12
73	I1F/P3G/I6E/T7K/S17K/N21R	FLGLLEKAAKVIPKIHK FFKRL	0.98 6	0.83	0.964	0.343	A/0.57	5	0.53 9	0.19
74	I1G/P3R/I6E/T7K/S17K/N21R	GLRLLEKAAKVIAKIHK FFKRL	0.99 2	0.8	0.939 2	0.180	NoA/0. 63	6	0.39 3	0.34
75	I1L/P3G/I6E/T7K/S17K/N21R	LLGLLEKAAKVIPKIHK FFKRL	0.98 0	0.77	0.976 9	0.189	A/0.61	5	0.53 5	0.16
76	I1V/P3G/I6E/T7K/S17K/N21R	VLGLLEKAAKVIPKIHK FFKRL	0.98 2	0.78	0.976 3	0.070	A/0.59	5	0.51 3	0.10
77	P3G/I6E/T7K/P13A/S17K/N21R	ILGLLEKAAKVIAKIHK FKRL	0.98 9	0.82	0.977 5	0.558	A/0.68	5	0.52 1	0.02
78	I1F/P3G/I6E/T7K/P13A/S17K/N21R	FLGLLEKAAKVIAKIHK FFKRL	0.99 0	0.83	0.953 9	0.538	A/0.68	5	0.52 0	0.13
79	I1L/P3G/I6E/T7K/P13A/S17K/N21R	LLGLLEKAAKVIAKIHK FFKRL	0.98 4	0.77	0.970 8	0.352	A/0.69	5	0.51 6	0.10
80	I1V/P3G/I6E/T7K/P13A/S17K/N21R	VLGLLEKAAKVIAKIHK FFKRL	0.98 7	0.78	0.970 2	0.122	A/0.69	5	0.49 5	0.04

81	I1R/P3R/T7R/P13A/L22R	RLRLIRAAKVIKHSF FKNR	0.98 6	0.91	0.927 2	0.629	NoA/0. 76	7	0.39 6	0.18
82	P3R/L5R/I6E/P13A/S17K/N21 R	ILRLREKAAKVIKHK FFKRL	0.99 4	0.86	0.924 6	0.03	NoA/0. 59	7	0.35 2	0.28
83	I1F/P3R/I6E/T7K/P13A/S17G/ N21R	FLRLREKAAKVIKIHG FFKRL	0.99 1	0.88	0.931 1	0.049	NoA/0. 7	6	0.60 7	0.25
84	I1K/P3R/I6E/T7W/A8K/P13A/ S17R/N21R	KLRLLEWKAKVIKIH RFFKRL	0.99 5	0.91	0.955 1	0.079	NoA/0. 5	7	0.96 0	0.34
85	I1R/P3G/L5D/T7K/P13A/S17K /N21R	RLGLDIKAAKVIKHK FFKRL	0.98 2	0.77	0.977 1	0.424	NoA/0. 76	6	0.76 9	0.17

Probabilidad de ser antimicrobiano (AB) generada por:

^aCAMPR3

^bAntiBP3

^cAMPfun

Probabilidad de inducir hemólisis (HM) producida por:

^dHAPPENN

^eDBAASP

^fCarga (C) e hidrofobicidad (HD) obtenidas en HeliQuest.

^gPéptidos penetrantes en células (CPPs)

Anexo F: Valores de afinidad entre membranas y análogos.

Péptido	Valor de afinidad (Kcal/mol)	
	Membrana celular bacteriana (PBD: 2W6D)	Bio-membrana Gram positiva
Lineatina-2	-4,954	-6,754
4A5A	-4,645	-6,296
2A4A5A	-4,832	-6,730
4A5A11K13A15K	-4,867	-7,09
2A4A5A11K13A19K	-4,366	-6,451
4A11K13A19K	-4,574	-6,655
2A3K5A11K13A19K	-4,865	-6,266
4A5A11K13A	-5,083	-6,520
4A5A7R13A15K	-5,014	-7,018
1G3R6E7K17K21R	-5,356	-6,491
3R5R6E13A17K21R	-5,081	-6,203
1F3R6E7K13A17G21R	-5,459	-5,261
1K3R6E7W8R13A17R21R	-5,602	-6,520

*Nota: Los análogos resaltados en amarillo son aquellos que obtuvieron una mayor afinidad energética acoplamiento molecular.