



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Diseño de nuevos análogos peptídicos basados en la *pictuseptina-1*.

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ANDERSON RANDY YUMBO LICUY

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2025

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 31 de enero de 2025

De mi consideración:

Yo, Anderson Randy Yumbo Licuy con documento de identidad 155000600-9, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de 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,



Nombres y apellidos: Anderson Randy Yumbo Licuy

CI: 1550006009

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Tena, 31 de enero de 2025

Yo, Anderson Randy Yumbo Licuy, con documento de identidad 155000600-9 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Diseño de nuevos análogos peptídicos basados en la *pictuseptina 1*”, 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,



Nombres y apellidos: Anderson Randy Yumbo Licuy

CI: 1550006009

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Tena, 31 de enero de 2025

Certifico que el trabajo de titulación: “Diseño de nuevos análogos peptídicos basados en la *pictuseptina 1*”, aprobado bajo el mecanismo de titulación: tesis, fue realizado por Anderson Randy Yumbo Licuy, 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.

Firma Tutora:

Nombres y apellidos: Carolina Del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 1714818760

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Regional Amazónica Ikiam por brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto para la obtención de grado, así como por el acceso a sus instalaciones y recursos científicos.

A mi directora de tesis, Dra. Carolina Proaño Bolaños, por su invaluable guía, paciencia y apoyo a lo largo de este proceso. Gracias por compartir su conocimiento, inspirarme y motivarme a crecer académica y profesionalmente.

A la Dra. Cristina Quiroga, por sus valiosas sugerencias, comentarios y aportes, que enriquecieron el desarrollo de este trabajo y contribuyeron significativamente a su mejora.

DEDICATORIA

Agradezco de todo corazón a mi padre, madre y hermano, por ser mi mayor fuente de amor, apoyo y fortaleza. Su confianza en mí ha sido el pilar fundamental para seguir adelante en este camino.

Me agradezco a mí mismo por no rendirme a pesar de las dificultades, por enfrentar cada desafío con determinación y por seguir persiguiendo mis sueños con perseverancia.

A mis amigos Romel, Melanie, Dominic, Sebastián, por su amistad, compañía y por hacer de este proceso un recorrido más llevadero y significativo. Al igual agradecer a Mariana por estar presente en cada momento y por brindarme siempre palabras de aliento.

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

TABLA DE CONTENIDO

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
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
Resumen	xiii
Abstract.....	xiv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Péptidos antimicrobianos	1
1.1.2. Características de los AMPs	1
1.1.3. AMPs en secreciones de anuros	2
1.1.4. Limitaciones de los péptidos antimicrobianos	3
1.1.5. Importancia del diseño racional de los AMPs.....	4
1.1.6. Estrategias de diseño de los AMPs	4
1.1.7. Principales estrategias de diseño de los AMPs.....	4
1.1.8. Mutación dirigida al sitio y mapeo de actividad por truncamiento	6
1.1.9. Modificación in-sílico de los AMPs usando mutación dirigida al sitio.....	7
1.1.10. Mapeo de actividad por truncamiento.....	7
1.2. Planteamiento del problema a investigar	8

1.3.	Justificación de la investigación	10
1.4.	Objetivos de la investigación	11
CAPÍTULO II: Marco metodológico		12
2.1.	Estrategias de diseño	12
2.1.1.	Estrategia de sustitución por aminoácidos hidrofóbicos	12
2.1.2.	Estrategia de sustitución por aminoácidos catiónicos	14
2.1.3.	Mapeo de actividad por truncamiento.....	14
2.2.	Cribado para la selección de los análogos prometedores.....	14
2.2.1.	Predicción de la actividad antimicrobiana.....	15
2.2.2.	Predicción del efecto hemolítico	15
2.2.3.	Predicción de la tendencia a formar alfa hélice	16
2.2.4.	Predicción de la estabilidad	16
2.3.	Diseño tridimensional de los análogos prometedores.....	17
2.4.	Acoplamiento molecular.....	17
CAPÍTULO III: Resultados		19
3.1.	Cribado de los análogos prometedores.....	19
3.1.1.	Estrategia 1: Modificación por aminoácidos	20
3.1.3.	Estrategia 2: Mapeo de actividad por truncamiento.....	20
3.1.4.	Estrategia 3: Combinación polar/no polar de las estrategias 1 y 2	21
3.1.5.	Análogos prometedores	21
3.2.	Modelo estructural	25
3.3.	Acoplamiento molecular.....	27
3.3.1.	Puntuación de los mejores acoplamientos.....	27
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....		32
4.1.	Estrategias de diseño	32
4.2.	Cribado de los análogos mediante herramientas predictivas	33

4.4. Actividades adicionales de los análogos prometedores.....	36
4.5. Acoplamiento molecular.....	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2. Escalas de hidrofobicidad	13
Tabla 2-2. Parámetros de las herramientas de predicción antibacteriana	15
Tabla 3-2. Parámetros de las herramientas de predicción hemolítica.....	16
Tabla 4-2. Herramientas de predicción de estructura secundaria	16
Tabla 5-3. Secuencias de análogos prometedores.	23
Tabla 6-3. Propiedades fisicoquímicas y estructurales de los análogos prometedores.	23
Tabla 7-3. Predicción de actividad antibacterial de los Análogos prometedores	23
Tabla 8-3. Predicción de la actividad hemolítica de los análogos prometedores	24
Tabla 9-3. Predicción de la estabilidad en solución.....	24
Tabla 10-3. Predicción de actividades adicionales de los análogos: antifúngica y antiviral	25
Tabla 11-3. Puntuación de acoplamiento molecular. Interacción péptido - membrana Gramnegativa.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura secundaria representativa de AMPs.	2
Figura 2-3. Diagrama del proceso de cribado.....	20
Figura 3-3. Representación de la rueda helicoidal de seis análogos prometedores derivados de la Pictuseptina 1	22
Figura 4-3. Predicción de estructura de análogos prometedores.	26
Figura 5-3. Predicción de estructura de análogos prometedores cortos.....	27
Figura 6-3. La figura muestra la interacción entre la enzima 3 VMA y los análogos K12K19K22, R8R12R19R22 y R5R8R19R22.....	28
Figura 7-3. Interacción de los mejores análogos con la membrana Gramnegativa	30
Figura 8-3. Acoplamiento de los mejores análogos con la membrana celular humana 2MLR..	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análogos generados para el aumento de la cationicidad.	50
Anexo 2. Análogos generados para la disminución de la hidrofobicidad.....	52
Anexo 3. Mapeo de actividad por truncamiento realizado en CAMPR3.....	53
Anexo 4. Análogos generados para el aumento de la cationicidad	54
Anexo 5. Análogos generados para la disminución de la hidrofobicidad.....	54
Anexo 6. Análogos generados combinando ambas Polar-No polar	55
Anexo 7. Cribado por actividad antimicrobiana	56
Anexo 8. Cribado por efecto hemolítico.....	58
Anexo 9. Cribado por estructura alfa hélice α H	59
Anexo 10. Cribado de estabilidad en solución acuosa	60

Resumen

La resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza creciente para la salud pública, con proyecciones de hasta 10 millones de muertes en los próximos 25 años y un impacto económico superior a 100 billones de dólares para 2050. En este contexto, los péptidos antimicrobianos emergen como alternativas viables a los tratamientos convencionales. Esta investigación se centra en el diseño racional y optimización de análogos de *pictuseptina-1*, un péptido con actividad prometedora contra microorganismos patógenos. Se emplearon estrategias como la sustitución de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos en caras separadas, mapeo de actividad por truncamiento y la combinación de regiones polares y apolares para generar análogos anfipáticos con mejor estabilidad y funcionalidad. A través de herramientas bioinformáticas, se analizaron las propiedades fisicoquímicas, la estructura helicoidal y la interacción molecular con la enzima 3VMA, una membrana bacteriana Gram negativa y una membrana celular humana (2MLR). Los análisis de acoplamiento molecular revelaron que el análogo K12K19K22 presentó la mejor interacción con la enzima 3VMA, con una energía de unión de -6.915 kcal/mol, mientras que el análogo G4L5K10L11 mostró la mayor afinidad con la membrana Gram negativa (-7.138 kcal/mol). Por otro lado, el análogo R5R19L20R22 destacó por su baja toxicidad hacia células humanas, con una energía de unión de -1.99 kcal/mol. Estos hallazgos sugieren que los análogos diseñados podrían constituir candidatos prometedores como nuevos agentes antimicrobianos, combinando alta especificidad bacteriana con baja toxicidad hacia células humanas, ofreciendo así una alternativa innovadora en la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

PALABRAS CLAVE: Péptidos antimicrobianos, *pictuseptina-1*, diseño racional, herramientas *in silico*, análogos, acoplamiento molecular.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics represents a growing threat to public health, with projections of up to 10 million deaths in the next 25 years and an economic impact exceeding \$100 trillion by 2050. In this context, antimicrobial peptides emerge as viable alternatives to conventional treatments. This research focuses on the rational design and optimization of *pictuseptin-1* analogs, a peptide with promising activity against pathogenic microorganisms. Strategies such as cationic and hydrophobic amino acid substitution on separate faces, activity mapping by truncation and the combination of polar and apolar regions were employed to generate amphipathic analogues with improved stability and functionality. Through bioinformatics tools, physicochemical properties, helical structure and molecular interaction with 3VMA enzyme, a Gram negative bacterial membrane and a human cell membrane (2MLR) were analyzed. Molecular docking analyses revealed that the K12K19K22 analog presented the best interaction with the 3VMA enzyme, with a binding energy of -6,915 kcal/mol, while the G4L5K10L11 analog showed the highest affinity for the Gram negative membrane (-7,138 kcal/mol). On the other hand, the analog R5R19L20R22 stood out for its low toxicity towards human cells, with a binding energy of -1.99 kcal/mol. These findings suggest that the designed analogues could constitute promising candidates as new antimicrobial agents, combining high bacterial specificity with low toxicity towards human cells, thus offering an innovative alternative in the fight against antibiotic resistance.

KEY WORDS: Antimicrobial peptides, *pictuseptin-1*, rational design, *in silico* tools, analogs, molecular docking

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son considerados antibióticos naturales, ya que son producidos por varios organismos como mamíferos, artrópodos, plantas y bacterias (Martínez, 2020). También son definidos como péptidos de defensa del hospedador por su rol esencial en el sistema inmune innato de organismos multicelulares (Martínez, 2020). Generalmente, estos péptidos presentan una rápida y potente actividad (en el rango micromolar) contra un amplio espectro de microorganismos, como bacterias, virus, hongos y protozoos (Sánchez Acosta, 2016), incluso contra bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (Hof et al., 2001). Por otra parte, además de la actividad antimicrobiana, los AMPs presentan múltiples actividades inmunomoduladoras: pueden inducir la producción de quimiocinas, acelerar la angiogénesis, cicatrización de heridas y modular la apoptosis en organismos multicelulares (Guilhelmelli et al., 2013).

1.1.2. Características de los AMPs

Los péptidos antimicrobianos varían en secuencia, tamaño de 12 a 60 (rango) y estructura (α -hélice, lámina β , α -hélice/ lámina β y las lineales o aleatorias) (Figura 1) (Huerta-Cantillo & Navarro-García, 2016; Olascoaga-Del Angel et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los AMPs se caracterizan por sus propiedades catiónicas, hidrofóbicas y anfipáticas (Li et al., 2019). Esto implica que poseen una carga neta positiva, la cual oscila entre +2 y +9 (Li et al., 2019). Están compuestos por dominios hidrofílicos que incluyen aminoácidos cargados positivamente, como lisina (K) y arginina

(R). Estos dominios interactúan con la membrana microbiana, que está cargada negativamente. Por otro lado, contienen dominios hidrofóbicos formados por aminoácidos lipofílicos, como triptófano (W), prolina (P) y fenilalanina (F). Estos últimos facilitan la permeabilización y la interrupción de la **membrana (Hou et al., 2010)**. Por ello, es crucial que estos AMPs mantengan un equilibrio entre ambos dominios para ejercer su función antimicrobiana de manera eficaz.

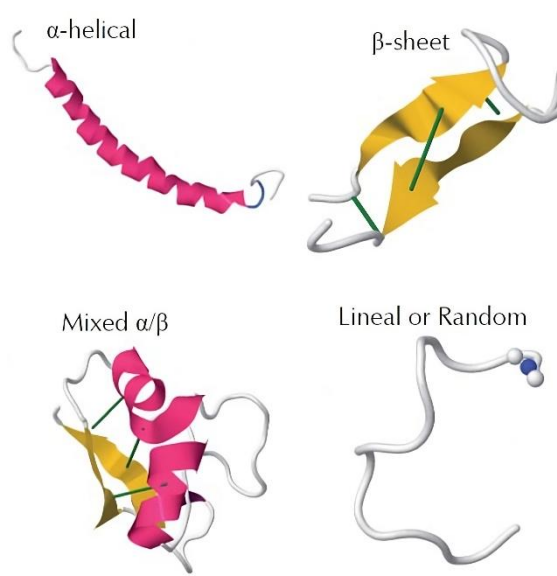


Figura 1-1. Estructura secundaria representativa de AMPs. α-hélice (Moricina), β-hoja (Hepcidina-20), mezcla α-hélice/β-hoja, (Hidramacina-1) y lineal o aleatoria (Lf11). Las estructuras α-hélice se muestran en magenta, las β-hoja en amarillo y las líneas verdes representan los puentes disulfuro.

Fuente: Huerta-Cantillo & Navarro-García, 2016

1.1.3. AMPs en secreciones de anuros

Desde el descubrimiento inicial de la lisozima, se han aislado e identificado más de 3300 **AMPs** naturales de una amplia gama de especies, incluidos anfibios, mamíferos, invertebrados, plantas y microorganismos (Lai et al., 2022). Se encuentran en insectos, mamíferos, bacterias, anfibios y crustáceos, con una distribución muy amplia en la naturaleza (Powers & Hancock, 2003). En particular, se ha observado un interés creciente en los péptidos antimicrobianos presentes en la piel de los anfibios debido a su amplia gama de actividad microbicida. Estos AMPs son efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, cepas de levadura, hongos, protozoos e incluso virus. Además, algunos han demostrado actividad anticancerígena y hemolítica (Rinaldi,

2002). Los péptidos antimicrobianos de las secreciones de anuros suelen contener entre 10 y 60 residuos de aminoácidos. La mayoría son catiónicos debido a la presencia de múltiples residuos de lisina, y poseen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, como leucina e isoleucina, que favorecen su interacción con las membranas de los microorganismos (Powers & Hancock, 2003). Por otro lado, tienden a formar una hélice α anfipática en entornos lipídicos o solventes que mimetizan membranas, como el trifluoroethanol al 50% en agua (Pukala et al., 2006).

1.1.4. Limitaciones de los péptidos antimicrobianos

Los AMPs poseen varias ventajas en comparación con los antibióticos convencionales, tales como: amplio espectro de acción, alta potencia, baja toxicidad para las células eucariotas, una sólida estabilidad térmica, una alta solubilidad, un bajo peso molecular y baja posibilidad de que los microorganismos generen resistencia (Li et al., 2019). Sin embargo, los péptidos antimicrobianos naturales no son una panacea y tienen muchas limitaciones inherentes a su aplicación, incluido el alto costo de producción, la actividad inestable, la sensibilidad a las proteasas y al pH extremo, y datos de seguridad toxicológica incompletos (Ji et al., 2024). Para abordar estas limitaciones, se han desarrollado diversas estrategias destinadas a optimizar los péptidos antimicrobianos (AMPs), con el objetivo de mejorar su eficacia y reducir efectos adversos, como la citotoxicidad. Entre estas estrategias, el diseño racional se ha consolidado como un enfoque clave, permitiendo la modificación específica de secuencias peptídicas para potenciar su actividad antimicrobiana sin comprometer la selectividad hacia células humanas. Este enfoque implica la identificación y modificación de regiones críticas dentro de la estructura del péptido, utilizando herramientas bioinformáticas y modelos computacionales para predecir su comportamiento en distintos entornos biológicos (Mahlapuu et al., 2016). Además, estrategias complementarias como la introducción de modificaciones químicas, la incorporación de aminoácidos no naturales y la optimización de parámetros fisicoquímicos han demostrado ser efectivas para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de estos compuestos (Mahlapuu et al., 2016).

1.1.5. Importancia del diseño racional de los AMPs

A través del diseño racional, se busca optimizar la eficacia antimicrobiana de los péptidos, al mismo tiempo que se reduce su citotoxicidad en las células humanas (Azmi et al., 2016). Esta estrategia consiste en diseñar péptidos nuevos manteniendo las características esenciales de las mismas, como su naturaleza catiónica, la presencia de regiones anfipáticas y la estructura tridimensional (Huerta-Cantillo & Navarro-García, 2016). Estas características son fundamentales para determinar la eficacia antimicrobiana de los péptidos (Huerta-Cantillo & Navarro-García, 2016). En este contexto, a continuación, se detallan algunos de los métodos usados para el mejoramiento de los AMPs.

1.1.6. Estrategias de diseño de los AMPs

Las metodologías más conocidas que se han utilizado para diseñar nuevos AMPs son la mutagénesis dirigida al sitio (Torres et al., 2019a), enfoque asistido por plantilla (J. Wang et al., 2015), diseño novo (Pathak & Chauhan, 2011), las bibliotecas sintéticas (Porto et al., 2018), autoensamblaje de los AMPs y modificación química (González García et al., 2017). Estas estrategias son conceptualmente diferentes, pero comparten el mismo objetivo de diseñar péptidos mejorados (Torres et al., 2019).

1.1.7. Principales estrategias de diseño de los AMPs

Mutación dirigida al sitio: El método implica modificar péptidos naturales mediante la adición, eliminación o sustitución selectiva de aminoácidos, lo que permite comprender los impactos funcionales de estas modificaciones en el péptido original. Para mejorar su actividad, se suelen emplear aminoácidos con características químicas específicas: cargados positivamente (como arginina e histidina) para aumentar la interacción con membranas bacterianas; hidrofóbicos (como triptófano y fenilalanina) para mejorar la inserción en la bicapa lipídica; D-aminoácidos para conferir mayor resistencia a la degradación por proteasas; y cisteína, que facilita la formación de puentes disulfuro, estabilizando la estructura. También se pueden introducir aminoácidos no naturales,

como homoarginina, para mejorar la estabilidad y actividad antimicrobiana. La identificación de variantes con mejor funcionalidad requiere mutaciones sistemáticas en las moléculas peptídicas, explorando así una amplia gama de secuencias posibles (Torres et al., 2019).

Enfoque asistido por plantilla: El enfoque asistido por plantilla utiliza la comparación de secuencias de péptidos antimicrobianos naturales para identificar patrones clave en su estructura y función, como la distribución de residuos cargados e hidrofóbicos. A partir de este análisis, se diseñan nuevos péptidos optimizados con propiedades mejoradas, empleando herramientas computacionales y algoritmos predictivos. Posteriormente, los péptidos diseñados se validan experimentalmente para evaluar su actividad antimicrobiana, hemólisis y estabilidad, permitiendo ajustes adicionales para mejorar su eficacia y reducir su toxicidad (J. Wang et al., 2015).

Péptidos Novo: El diseño novo implica la creación de secuencias completamente nuevas sin basarse en péptidos naturales, sino en principios fisicoquímicos que favorecen la actividad antimicrobiana. Este enfoque se centra en la disposición estratégica de residuos básicos e hidrófobos para generar anfipaticidad, una característica clave para la interacción con membranas bacterianas. Al optimizar la estructura secundaria, como hélices α o láminas β , se mejora la inserción del péptido en la membrana, aumentando su eficacia antimicrobiana. Además, herramientas computacionales y modelos de diseño racional permiten ajustar propiedades como la carga neta, la hidrofobicidad y la estabilidad, optimizando así la selectividad y reduciendo la toxicidad en células humanas (Pathak & Chauhan, 2011).

Bibliotecas sintéticas: Las bibliotecas sintéticas son colecciones diseñadas de péptidos u otras moléculas generadas mediante síntesis química combinatoria o técnicas de evolución dirigida, permitiendo la exploración sistemática de variaciones estructurales para optimizar su función. Estas bibliotecas pueden crearse a partir de secuencias aleatorias o basadas en motivos conservados de péptidos antimicrobianos naturales, facilitando la identificación de nuevas secuencias con mayor eficacia antimicrobiana, menor toxicidad y mayor estabilidad frente a la degradación enzimática. Además, su uso combinado con cribado de alto rendimiento y herramientas computacionales acelera el descubrimiento de péptidos con mejores propiedades farmacológicas, aumentando la

posibilidad de desarrollar nuevos antibióticos efectivos contra patógenos resistentes (Hancock & Sahl, 2006).

Autoensamblaje: El diseño de péptidos mediante autoensamblaje permite la formación espontánea de estructuras ordenadas, como nanofibras, nanotubos e hidrogeles, mediante interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas. Este proceso es clave en el desarrollo de los AMPs, ya que facilita la creación de estructuras tridimensionales estables con aplicaciones en medicina regenerativa, administración de fármacos y nanotecnología. Además, en el caso de los AMPs, el autoensamblaje favorece la formación de hélices α y hojas β , esenciales para su actividad biológica, y permite diseñar materiales con propiedades electrónicas y ópticas para dispositivos biomédicos y sensores (Gazit, 2007).

Modificaciones químicas: El diseño de péptidos mediante modificación química busca mejorar sus propiedades y funcionalidades, especialmente en AMPs. Entre las modificaciones utilizadas están la fosforilación de residuos, la adición de D-aminoácidos o aminoácidos no naturales como homoarginina, la ciclación, la halogenación, la acetilación y el uso de peptidomiméticos, estrategias que aumentan su estabilidad frente a proteasas. Además, se pueden introducir grupos funcionales para facilitar su detección y purificación, así como modificar las cadenas laterales para mejorar su actividad biológica y especificidad, lo que resulta clave en aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas (González García et al., 2017).

1.1.8. Mutación dirigida al sitio y mapeo de actividad por truncamiento

La mutación dirigida al sitio y el mapeo de actividad por truncamiento se usan como estrategias debido a su capacidad para optimizar características específicas de los AMPs de manera *in silico*. Estas técnicas permiten modificar aspectos clave como la carga catiónica y la hidrofobicidad, lo que mejora la actividad antimicrobiana y reduce la toxicidad hacia células de mamíferos (Torres et al., 2019) (Kumar et al., 2012). A pesar de la existencia de otras estrategias, estas ofrecen una forma más precisa y controlada de generar modificaciones sin requerir largos procesos experimentales, lo que hace que sean una opción eficiente para diseñar AMPs con propiedades mejoradas.

1.1.9. Modificación in-silico de los AMPs usando mutación dirigida al sitio

Los dos principales objetivos de la mutación dirigida al sitio consisten en aumentar la actividad antimicrobiana y reducir la citotoxicidad en células de mamíferos, mediante la sustitución, delección o añadiendo uno o varios aminoácidos (Bermúdez Puga, 2021).

Aumento de la cationicidad: Consiste en modificar selectivamente la secuencia de un péptido, añadiendo, eliminando o sustituyendo aminoácidos, con el objetivo de mejorar su actividad antimicrobiana y reducir la toxicidad hacia las células de mamíferos. Por ejemplo, Du et al (2014) construyeron dos análogos denominados AcrAP1a y ACrAp2b a partir de los péptidos AcrAP1 y ACrAp2, utilizando residuos de lisina cargados positivamente para sustituir los residuos de serina con carga neutra. Los péptidos modificados pasaron de tener carga +2 a +6, mostrando mayor actividad contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* (Du et al., 2014).

Disminución de la hidrofobicidad: Análogos peptídicos menos hidrofóbicos con una distribución separada de aminoácidos cargados positivos conlleva a una reducción en la hemólisis (Bermúdez Puga, 2021). En un estudio realizado por Zhou et al (2019) diseñaron dos análogos denominados PMAP-37 (R13-I) y PMAP-37 (K20/27-I) optimizando la hidrofobicidad. Los dos análogos exhibieron un aumento en el promedio general de hidrofobicidad (de -0.724 a -0.481 para PMAP-37(R13-I) y de -0.724 a -0.270 para PMAP-37(K20/27-I). También, estos nuevos péptidos mostraron una mayor actividad antimicrobiana frente al péptido original (J. Zhou et al., 2019).

1.1.10. Mapeo de actividad por truncamiento

El mapeo de actividad por truncamiento de péptidos implica eliminar segmentos de la secuencia peptídica para identificar las regiones esenciales para su actividad antimicrobiana. Este enfoque ayuda a diseñar péptidos más eficaces y menos tóxicos al reducir su longitud sin comprometer su funcionalidad (Li et al., 2017). Por ejemplo: el péptido DMPC-19, generado a partir de la delección de 9 aminoácidos de la secuencia del péptido DMPC, presentó una hemólisis menor al 10% a la concentración de 256 μ M. Mientras que, DMPC presentó >80% de hemólisis en dicha concentración [30]. De igual manera sucedió con RPb, un segmento de 16 residuos de aminoácidos N-terminal, que

redujo la toxicidad hacia eritrocitos en comparación del péptido molde Ranatuerin-2Pb (X. Zhou et al., 2019).

1.1.11. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta fundamental para el estudio de las interacciones proteína-péptido y para la evaluación de su interacción con las membranas bacterianas (Hendlich, 1998). En el caso del desarrollo de péptidos antimicrobianos, este enfoque permite comprender cómo estos compuestos se unen a proteínas bacterianas clave o penetran en la membrana celular, determinando así su mecanismo de acción y eficacia. Mediante algoritmos computacionales avanzados, el acoplamiento molecular predice los posibles modos de unión entre los péptidos y sus dianas bacterianas y evalúa tanto el ajuste estructural como la estabilidad energética de la interacción (Hendlich, 1998). Al estudiar la unión de péptidos antimicrobianos a proteínas bacterianas, el docking ayuda a identificar áreas críticas de interacción, como sitios enzimáticos activos o dominios específicos implicados en la resistencia a los antimicrobianos. Esto es crucial para optimizar el diseño de péptidos con mayor selectividad y eficacia contra los patógenos (Bissantz et al, 2000).

Por otra parte, el acoplamiento de péptidos a la membrana bacteriana plantea un reto adicional, ya que requiere modelizar la interacción con una estructura dinámica y heterogénea de fosfolípidos y otras moléculas. Por lo cual, estos estudios proporcionan información clave sobre los mecanismos de permeabilización de membrana, facilitando el diseño de péptidos con una mejor capacidad de disrupción de la barrera celular bacteriana sin afectar células humanas (Sharma et al, 2022).

1.2. Planteamiento del problema a investigar

El aumento global de la resistencia a los antibióticos, alimentado por el uso inadecuado de estos medicamentos, ha generado una crisis de salud pública (Årdal et al., 2020). Patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*, responsables de numerosas

muertes, han desarrollado resistencia a los tratamientos disponibles, haciendo que estos antibióticos pierdan eficacia (Årdal et al., 2020; Breijyeh et al., 2020). Esta situación se agrava por el aumento de la morbilidad y mortalidad, superando incluso enfermedades como el VIH y la malaria en términos de muertes causadas por infecciones resistentes (Breijyeh et al., 2020). La resistencia antimicrobiana está llevando a un incremento de las estancias hospitalarias, el costo de la atención y el riesgo de muerte (Golkar et al., 2014). Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) calcula que podría ocasionar 10 millones de muertes en los próximos 25 años y dejar pérdidas económicas que superarían los 100 billones de dólares en el 2050 (OPS, 2021). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre las bacterias de mayor preocupación se encuentran las Gram negativas resistentes a carbapenémicos como *Acinetobacter baumannii* y enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación, así como *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina (OMS, 2024). Esta situación es especialmente preocupante en América Latina, donde factores como el acceso limitado a medicamentos, la automedicación y la falta de controles estrictos en el uso de antibióticos exacerban el problema (OMS, 2024).

En este contexto, se hace urgente la búsqueda de alternativas terapéuticas, y los AMPs surgen como una opción prometedora. Estos AMPs actúan alterando las membranas celulares bacterianas, lo que destruye las células patógenas (Lei et al., 2019). No obstante, su uso clínico se ve limitada principalmente por su baja biodisponibilidad, ya que son fácilmente degradados por enzimas en el tracto gastrointestinal o en la piel, lo que reduce su eficacia (Deslouches et al., 2020). Además, su susceptibilidad a la degradación enzimática disminuye la cantidad de péptido activo disponible, haciendo necesaria una administración continua. Un desafío adicional es la toxicidad hacia las células humanas, ya que los AMPs pueden afectar las membranas celulares eucariotas, especialmente en altas concentraciones. Para superar estos problemas, se han propuesto modificaciones estructurales que mejoren su estabilidad y selectividad hacia las bacterias, reduciendo los efectos secundarios (Deslouches et al., 2020). Por lo tanto, se requiere un enfoque de diseño in-sílico para modificar estos péptidos, ajustando sus características y minimizando sus efectos secundarios sin comprometer su efectividad antimicrobiana. Este enfoque también se encuentra respaldado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que destaca la necesidad de investigar nuevas formas de

combatir la resistencia a los antimicrobianos, especialmente ante la creciente amenaza de patógenos resistentes, como los Gram negativos resistentes a carbapenémicos y otros antibióticos de última línea (OMS, 2024).

1.3. Justificación de la investigación

Es urgente encontrar agentes antimicrobianos alternativos con nuevos mecanismos de acción (Morehead & Scarbrough, 2018). Dadas sus propiedades únicas, los AMPs tienen un potencial notable como agentes antimicrobianos de próxima generación. Sin embargo, su aplicabilidad clínica se ve obstaculizada por las limitaciones descritas anteriormente (Huan et al., 2020). Los AMPs poseen propiedades físicas y químicas únicas que pueden optimizarse mediante diversos enfoques de diseño para mejorar su potencial de aplicación terapéutica (Huan et al., 2020). Por lo tanto, superar estos desafíos es un área activa de investigación en el desarrollo de AMPs de alto rendimiento (Huan et al., 2020). En este sentido, el diseño *in silico* de los AMPs emerge como una herramienta prometedora en la búsqueda de nuevos tratamientos antimicrobianos. Debido a que este método permite la selección de secuencias de aminoácidos apropiadas, la optimización de las propiedades fisicoquímicas y la evaluación de la actividad contra los microorganismos objetivos (Lee et al., 2022). Los AMPs poseen propiedades físicas y químicas únicas que pueden optimizarse mediante diversos enfoques de diseño para mejorar su potencial de aplicación terapéutica (Huan et al., 2020).

El presente estudio utilizará como modelo al péptido antimicrobiano *pictuseptina-1*, el cual fue descrito previamente por Morán y colaboradores (2022). *Pictuseptina 1* posee una longitud de 22 residuos de aminoácidos, presenta una estructura hélice con cara hidrofóbica y su carga neta es de +2. Al igual, este péptido presentó una potente actividad antimicrobiana contra *E. coli* (CIM 6,83 uM), *S. aureus* (CIM 27,32 uM) y *C. albicans* (CIM 54, 64 uM) y un alto porcentaje de hemólisis (1-29%) (Morán-Marcillo et al., 2022). Estos resultados sugieren que si bien, *pictuseptina 1* es prometedora para combatir microorganismos patógenos, su citotoxicidad impide su inserción en el ámbito de la salud (Morán-Marcillo et al., 2022). Por lo tanto, esta investigación se centrará en el diseño de nuevos análogos peptídicos con mayor eficacia, selectividad, estabilidad y

baja citotoxicidad, usando como modelo *pictuseptina 1*, con el fin de superar las limitaciones actuales y contribuir al arsenal terapéutico contra la resistencia antimicrobiana.

1.4. Objetivos de la investigación

Objetivo general

Diseñar análogos inspirados en la *pictuseptina-1* (PTS-1) que presenten actividad antimicrobiana más potente y citotoxicidad reducida.

Objetivos específicos

- Diseñar análogos de *pictuseptina-1* mediante modificación dirigida al sitio, cambiando las propiedades fisicoquímicas y estructurales del péptido.
- Emplear herramientas bioinformáticas para comprobar la eficacia de dichas modificaciones.
- Determinar los análogos más prometedores que poseen actividad antimicrobiana mejorada y baja toxicidad utilizando herramientas *in silico*.
- Evaluar el potencial antimicrobiano de los análogos prometedores mediante acoplamiento molecular.

CAPÍTULO II: Marco metodológico

2.1. Estrategias de diseño

Se **empleó** como arquetipo el péptido *pictuseptina-1* para diseñar análogos mejorados. Se introdujo la secuencia GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT en HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) para generar el diagrama helicoidal y, para definir sus propiedades fisicoquímicas, se emplearon las herramientas AntiBP3 y DBAASP, con el objetivo de obtener datos sobre hidrofobicidad, carga, punto isoelectrico y peso molecular. Asimismo, se **utilizó** la herramienta PRABI (https://npsaprabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) para analizar la tendencia a formar estructuras helicoidales.

2.1.1. Estrategia de sustitución por aminoácidos hidrofóbicos

De acuerdo con la bibliografía, se analizó la secuencia con el fin de determinar los aminoácidos hidrofílicos, hidrofóbicos y neutros del péptido. Una vez realizado esto, se utilizaron aminoácidos como Phe, Val, Ile y Leu con la finalidad de aumentar la hidrofobicidad de los **AMPs**. Se reemplazaron los aminoácidos menos hidrofóbicos por aminoácidos más hidrofóbicos. Asimismo, se elaboró una tabla en la que se identificaron los aminoácidos hidrofílicos y neutros con el propósito de sustituirlos por otros más hidrofóbicos (**Tabla 1-1**) (**Bermúdez Puga, 2021**). Posteriormente, se analizaron sus propiedades fisicoquímicas utilizando las herramientas HeliQuest, AntiBP3 y DBAASP para verificar si los análogos obtenían resultados positivos.

Tabla 1-1. Escalas de hidrofobicidad

Aminoácido		K&D	Normalizado	Tipo
Nombre	Símbolo	Escala	Valor	
Isoleucina	I	+4,5	0,05	Hidrofóbico
Valina	V	+4,2	0,10	Hidrofóbico
Leucina	L	+3,8	0,15	Hidrofóbico
Fenilalanina	F	+2,8	0,20	Hidrofóbico
Cisteína	C	+2,5	0,25	Hidrofóbico
Metionina	M	+1,9	0,30	Hidrofóbico
Alanina	A	+1,8	0,35	Hidrofóbico
Glicina	G	-0,4	0,40	Neutro
Treonina	T	-0,7	0,45	Neutro
Serina	S	-0,8	0,50	Neutro
Triptófano	W	-0,9	0,55	Neutro
Tirosina	Y	-1,3	0,60	Neutro
Prolina	P	-1,6	0,65	Neutro
Histidina	H	-3,2	0,70	Hidrofílico
Glutamina	Q	-3,5	0,75	Hidrofílico
Asparagina	N	-3,5	0,80	Hidrofílico
Ácido glutámico	E	-3,5	0,85	Hidrofílico
Ácido aspártico	D	-3,5	0,90	Hidrofílico
Lisina	K	-3,9	0,95	Hidrofílico
Arginina	R	-4,0	1.00	Hidrofílico

Nota: Escala de hidrofobicidad de Kyle y Doolittle (K&D).

Fuente: Sastria, G., Liong, C.-Y., & Hashim, I. (2008)

2.1.2. Estrategia de sustitución por aminoácidos catiónicos

En esta estrategia, se seleccionaron los aminoácidos catiónicos lisina (Lys) y arginina (Arg), conocidos por incrementar la carga neta del péptido y mejorar su interacción con las membranas bacterianas cargadas negativamente. Inicialmente, se identificaron aminoácidos hidrofílicos neutros, como treonina (T) y asparagina (N), y se reemplazaron por los aminoácidos hidrofílicos positivos mencionados (Lys y Arg). Adicionalmente, los aminoácidos hidrofílicos con carga negativa, como aspartato (D), fueron sustituidos exclusivamente por arginina, con el objetivo de fortalecer las interacciones electrostáticas. Las modificaciones se realizaron en diferentes grados, incluyendo sustituciones simples, dobles, triples y cuádruples con Lys y Arg, para explorar cómo la combinación y cantidad de cambios afectaban las propiedades fisicoquímicas de los péptidos.

2.1.3. Mapeo de actividad por truncamiento

Para determinar qué parte de la secuencia del péptido poseía actividad, se utilizó el software CAMPR3 (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in>). Este método permitió identificar las regiones clave responsables de la actividad antimicrobiana, determinando cuál era la longitud óptima del péptido para maximizar su efectividad (Wang et al, 2022). Usando CAMPR3, se predijeron las propiedades antimicrobianas de los péptidos truncados y se seleccionaron los más prometedores para su posterior análisis y mejora.

2.2. Cribado para la selección de los análogos prometedores

Una vez generada la biblioteca de análogos mediante las estrategias descritas, se llevó a cabo un proceso de cribado con el objetivo de seleccionar los análogos más prometedores. Para ello, se emplearon diversas herramientas *in silico*, siguiendo un filtrado secuencial. Primero, se predijo la actividad antibacteriana, luego se evaluó el efecto hemolítico, seguido por la predicción del porcentaje de helicidad y la estructura secundaria del péptido. Finalmente, se verificó la estabilidad de los análogos en soluciones acuosas y, para los análogos prometedores, se utilizó I-TASSER para modelar

su estructura tridimensional. Este enfoque permitió seleccionar los candidatos más prometedores con las mejores características funcionales, estructurales y de estabilidad.

2.2.1. Predicción de la actividad antimicrobiana

Para verificar si cada análogo es potencialmente antimicrobiano, se utilizaron herramientas *in silico* como CAMPR3, AntiBP3 y AMPfun. CAMPR3 (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/predict/>) proporciona información detallada sobre los AMPs, incluyendo sus secuencias, estructuras, actividades, firmas, organismos de origen y de destino (Waghu et al., 2016). AntiBP3 (https://webs.iitd.edu.in/raghava/antibp3/disp_GV.php?ran=42090) predice péptidos antibacterianos para diferentes grupos de bacterias utilizando información de secuencia como entrada. Por último, AMPfun (<http://fdblab.csie.ncu.edu.tw/AMPfun/index.html>) implementa modelos basados en Random Forest (RF) que clasifican entre AMP y no AMP, y predicen las actividades funcionales de los AMPs, incluidos sus posibles tipos de objetivos (Chung et al., 2019).

Tabla 2-2. Parámetros de las herramientas de predicción antibacteriana

Predictor	Algoritmo	SN	SP	ACC
CAMPR3	SVM	90,6	81,58	89,3%
AntiBP3	RF	80,7	90,3	85,5%
AMPfun	RF	83,9	90,1	87%

Nota: SVM (Máquina de Vectores de Soporte), RF (Bosque Aleatorio), SN (Sensibilidad), SP (Especificidad) y ACC (Precisión global).

Realizado por: Yumbo, 2025.

2.2.2. Predicción del efecto hemolítico

En esta fase, se analizó el potencial hemolítico de los péptidos diseñados y su toxicidad en células. Para ello, se empleará HAPPENN (<https://research.timmons.eu/happenn>), que predice la actividad hemolítica basada en una biblioteca de péptidos analizados de manera *in-sílico* (Meher et al., 2017). Finalmente, se utilizó DBAASP

(<https://dbaasp.org/tools?page=property-calculation>) para predecir la toxicidad de los análogos.

Tabla 3-2. Parámetros de las herramientas de predicción hemolítica

Predictor	Algoritmo	SN	SP	ACC
DBAASP	MLA	65,95	89,92	56,35%
HAPPENN	RN	84,96	86,09	85,66%

Nota: SN (Sensibilidad), SP (Especificidad), ACC (Precisión), MLA (Algoritmo de Aprendizaje Automático) y RN (Red Neuronal Artificial).

Realizado por: Yumbo, 2025.

2.2.3. Predicción de la tendencia a formar alfa hélice

Para el análisis de la estructura secundaria, utilizamos dos herramientas: PRABI y Jpred4. Estas herramientas nos permitirán detallar la forma que adquirirán cada uno de los análogos. Se emplearon las 2 herramientas para asegurar un análisis detallado y completo.

Tabla 4-2. Herramientas de predicción de estructura secundaria

Método	Algoritmo	SN	SP	ACC
PRABI	RN	-	-	80%
Jpred4	RN	-	-	82%

Nota: SN (Sensibilidad), SP (Especificidad), ACC (Precisión), MLA (Algoritmo de Aprendizaje Automático) y RN (Red Neuronal Artificial).

Realizado por: Yumbo, 2025.

2.2.4. Predicción de la estabilidad

ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) fue una herramienta utilizada para predecir la estabilidad de péptidos en soluciones acuosas (Garg et al., 2016). A través del análisis de parámetros fisicoquímicos, como la composición de aminoácidos y la propensión a formar estructuras secundarias estables, permitió evaluar la viabilidad de los péptidos en condiciones fisiológicas.

2.3. Diseño tridimensional de los análogos prometedores

Se utilizó la herramienta I-TASSER para modelar la estructura tridimensional de los análogos más prometedores y obtener archivos PDB. Esta herramienta nos permitió obtener representaciones estructurales detalladas de los péptidos seleccionados, dándonos una visión más precisa de su conformación y estabilidad en el contexto biológico. Esta herramienta utiliza el método threading, una técnica de predicción estructural que adapta la secuencia de una proteína a modelos estructurales conocidos, incluso en ausencia de homologías claras. I-TASSER utiliza algoritmos como LOMETS para identificar patrones en el PDB, ensamblar fragmentos estructurales y optimizarlos mediante simulaciones Monte Carlo, lo que permite modelizar proteínas con pocas similitudes con estructuras conocidas (Wu & Zhang, 2007). Este paso fue crucial para evaluar la viabilidad de los análogos antes de pasar a pasos experimentales más complejos, como el acoplamiento molecular, para garantizar que las estructuras obtenidas son adecuadas para estudios posteriores.

2.4. Acoplamiento molecular

Para evaluar el desempeño de los análogos diseñados de *pictuseptina-1*, se llevó a cabo un acoplamiento molecular (docking) con estructuras objetivo seleccionadas. Inicialmente, se generaron las estructuras tridimensionales de los análogos en formato PDB mediante la herramienta I-TASSER, asegurando una representación precisa de sus características estructurales. La enzima utilizada en el acoplamiento molecular (PDB ID: 3VMA) fue seleccionada debido a que investigaciones previas realizaron un análisis de docking con el péptido *pictuseptina-1* original, proporcionando una referencia adecuada para comparar el rendimiento de los análogos (Rengifo-Lema et al., 2024).

La estructura 3VMA corresponde a la proteína 1b de unión a penicilina (PBP1b) de *Escherichia coli*, determinada por criomicroscopía electrónica con una resolución de 2,16 Å. La PBP1b es una enzima bifuncional clave de la biosíntesis de la pared celular bacteriana con un dominio transglicosilasa responsable de la polimerización de los glicanos y un dominio transpeptidasa sensible a las penicilinas y esencial para la reticulación de los peptidoglicanos (Caveney et al., 2021).

Este enfoque permitió determinar si los análogos diseñados ofrecen mejoras en la interacción molecular en comparación con el péptido original. Adicionalmente, se incluyeron dos membranas como estructuras objetivo: una membrana Gram negativa bacteriana, específica de *E. coli* (obtenida de CHARMM-GUI), y una membrana humana (PDB ID: 2MLR). La elección de la membrana Gram negativa tuvo como objetivo evaluar la interacción antimicrobiana de los análogos frente a bacterias representativas, mientras que la inclusión de la membrana humana permitió estudiar el potencial hemolítico y predecir posibles efectos adversos sobre células humanas. El proceso de preparación de las estructuras comenzó con la limpieza de las enzimas y membranas utilizando UCSF Chimera, eliminando moléculas no relevantes, como agua y ligandos. Posteriormente, se utilizaron AutoDockTools para preparar los complejos, añadiendo cargas eléctricas y átomos de hidrógeno a los análogos y estructuras objetivo. El docking molecular se realizó con AutoDock Vina (v.1.2.5), que permitió obtener la energía de interacción expresada como afinidad (kcal/mol) (Trott et al., 2010). Esta herramienta clasifica las conformaciones del ligando en función de su afinidad y proporciona información sobre la energía de unión para cada conformación. También tiene en cuenta las distancias RMSD con respecto a la mejor conformación, representadas por el límite inferior RMSD (rmsd l.b.) y el límite superior RMSD (rmsd u.b.), que reflejan los límites inferior y superior de la RMSD con respecto a la mejor conformación (Trott et al., 2010). Este método es esencial para evaluar las interacciones y la afinidad de péptidos con diferentes estructuras y proporciona información importante sobre la eficacia de los ligandos y su potencial para aplicaciones biológicas. Al igual, el análisis de los valores de RMSD ayuda a comprender la estabilidad y precisión de las conformaciones predichas, lo que es crucial para el desarrollo de fármacos y la optimización de las interacciones moleculares (Trott et al., 2010).

CAPÍTULO III: Resultados

3.1. Cribado de los análogos prometedores

Mediante tres estrategias se generó una amplia variedad de análogos peptídicos con el objetivo de optimizar su actividad. Estos análogos fueron sometidos a diversos filtros (Figura 2-3) para identificar y seleccionar aquellos con el mayor potencial.

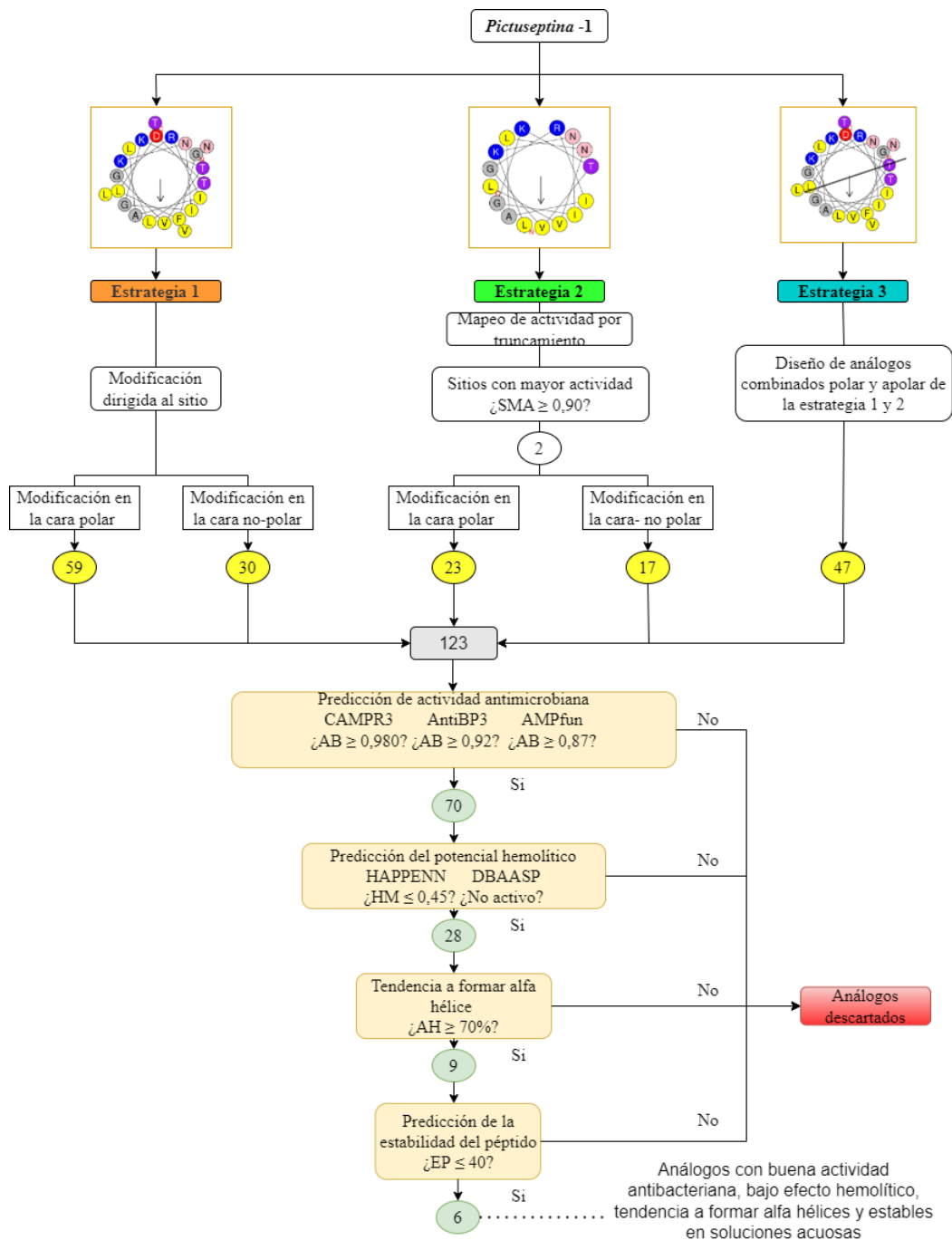


Figura 2-3. Diagrama del proceso de cribado. La estrategia 1 (naranja), la estrategia 2 (verde) y la estrategia 3 (azul) representan los diferentes enfoques utilizados. Los círculos en amarillo indican los análogos generados por las tres estrategias, mientras que los niveles en color vainilla representan el filtrado de péptidos. Los círculos celestes corresponden a los análogos cribados, y los análogos descartados se muestran en rojo.

Realizado por: Yumbo, 2025.

Las diversas estrategias empleadas en la creación de análogos prometedores permitieron obtener seis péptidos con un alto potencial antimicrobiano (Tabla 5-3). El rango de CAMPR3 oscila entre 0,85 y 1, el de AntiBP3 entre 0,85 y 0,993, y el de AMPfun entre 0,85 y 0,995 (Tabla 7-3). Un bajo efecto hemolítico con valores que oscilan de 0,185 a 0,477 (Tabla 8-3), una marcada tendencia a formar estructuras alfa hélice, y una mayor estabilidad en solventes. Cada una de las herramientas utilizadas en el proceso de cribado contribuyó significativamente a asegurar que este procedimiento se llevara a cabo de manera eficaz y precisa, permitiendo la selección de los análogos más prometedores. Además, el uso combinado de herramientas para el cribado antibacteriano como CAMPR3, AntiBP3 y AMPfun, junto con las herramientas para evaluar el efecto hemolítico (HAPPENN y DBAASP), la tendencia a formar alfa hélice (PRABI) y la estabilidad en solventes (ProtParam), garantiza un análisis exhaustivo y un filtrado adecuado según los criterios preestablecidos. Este enfoque integral incrementó significativamente la probabilidad de éxito en la identificación de péptidos con propiedades ideales para su aplicación antimicrobiana, asegurando no solo su efectividad contra microorganismos, sino también su seguridad y estabilidad en diferentes condiciones.

3.1.1. Estrategia 1: Modificación por aminoácidos

Empleando el diseño de nuevos análogos peptídicos utilizando la estrategia 1, se realizaron sustituciones en la cara polar y no polar del péptido. Se generaron 59 análogos en la cara polar (Anexo 1) y 30 en la no polar (Anexo 2).

3.1.3. Estrategia 2: Mapeo de actividad por truncamiento

En esta estrategia se utilizó CAMPR3 para identificar el sitio del péptido con mayor actividad antimicrobiana. CAMPR3 generó 10 análogos, de los cuales se seleccionaron 2 por tener un valor de actividad superior a ($\geq 0,90$) (Anexo 3). A partir de estos dos, se realizaron sustituciones en la cara polar, generando 23 péptidos, y en la cara no polar, obteniendo 17 péptidos.

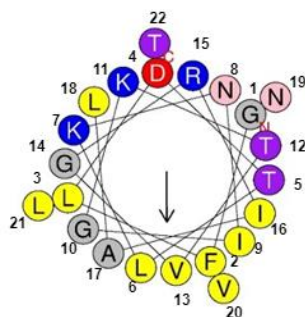
3.1.4. Estrategia 3: Combinación polar/no polar de las estrategias 1 y 2

La estrategia 3 se basa en combinar las caras polar y no polar obtenidas de las estrategias 1 y 2. Como resultado de esta combinación, se generaron 25 análogos a partir de las caras de la estrategia 1, mientras que la combinación de las caras de la estrategia 2 produjo 22 péptidos. En total, esta estrategia dio lugar a la creación de 47 análogos combinando ambas caras.

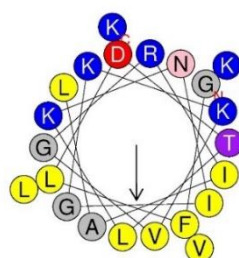
3.1.5. Análogos prometedores

La biblioteca de péptidos generada incluyó un total de 123 análogos diseñados a partir de tres estrategias distintas. Estos análogos fueron sometidos a un proceso de cribado utilizando una serie de filtros para identificar los péptidos con mejores propiedades fisicoquímicas, estructurales y estabilidad potencial. Como resultado de este cribado, se seleccionaron 6 análogos prometedores. Únicamente estos 6 análogos fueron sometidos a análisis detallados mediante la herramienta HeliQuest, la cual permitió evaluar la conformación de los péptidos en forma de rueda helicoidal. Este análisis proporcionó información clave sobre la distribución de cargas, la hidrofobicidad y otras características relacionadas con su estructura secundaria, relevantes para su posible actividad antimicrobiana.

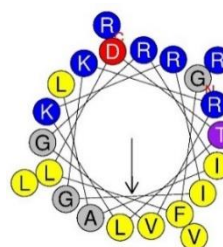
Pictuseptina-1



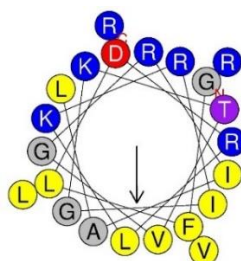
a) K12K19K22



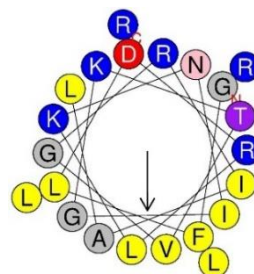
b) R8R12R19R22



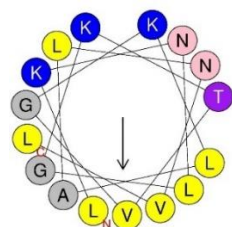
c) R5R19L20R22



d) R5R19L20R22



e) L4K10L11



f) G4L5K10L11

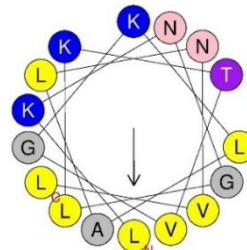


Figura 3-3. Representación de la rueda helicoidal de seis análogos prometedores derivados de la *pictuseptina 1*. En HeliQuest se obtuvo las ruedas helicoidales de los 6 análogos prometedores, las cuales fueron a) K12K19K22, b) R8R12R19R22, c) R5R19L20R22, d) R5R19L20R22, e) L4K10L11 y f) G4L5K10L11.

Cada rueda ilustra la distribución de los residuos en la hélice α , destacando las regiones hidrofóbicas (amarillo) e hidrofílicas (azul y rosa). Esta disposición sugiere un diseño que favorece la interacción con membranas, manteniendo un balance adecuado entre polaridad e hidrofobicidad, características clave para su actividad antimicrobiana.

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 5-3. Secuencias de análogos prometedores. Los aminoácidos reemplazados en los análogos fueron resaltados en rojo.

N°	Péptido	Secuencias
0	<i>Pictuseptina-1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT-NH2
1	K12K19K22	GFLDTLKNIGK K VGRIAL KVLK -NH2
2	R8R12R19R22	GFLDTLK R IG KR VGRIAL RVL R-NH2
3	R5R8R19R22	GFLD RLK R IGKTVGRIAL RVL R-NH2
4	R5R19L20R22	GFLD RL KNIGKTVGRIAL RLL R-NH2
5	L4K10L11	LKN L GKTVG K LALNVLT-NH2
6	G4L5K10L11	LKN GL KTVG KL LALNVLT-NH2

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 6-3. Propiedades fisicoquímicas y estructurales de los análogos prometedores.

N°	Péptido	Hidrofobicidad	Carga	Punto Isoeléctrico	Peso molecular	Alfa hélice
0	<i>Pictuseptina-1</i>	-0,02	3	10,01	2344,15	68,18%
1	K12K19K22	-0,13	6	10,59	2412,36	72,73%
2	R8R12R19R22	-0,27	7	12,19	2538,47	72,73%
3	R5R8R19R22	-0,27	7	12,19	2538,47	72,73%
4	R5R19L20R22	-0,22	6	12,01	2510,42	77,27%
5	L4K10L11	-0,03	4	10,31	1681,36	81,25%
6	G4L5K10L11	-0,024	4	10,31	1353,97	81,25%

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 7-3. Predicción de actividad antibacterial de los Análogos prometedores: Probabilidades de eficacia. Los valores representados en la tabla son probabilidades donde 1 corresponde al 100%

Predicción antimicrobiana				
N°	Péptido	CAMP3	AntiBP3	AMPfun
0	<i>Pictuseptina-1</i>	0,922	0,86	0,9588
1	K12K19K22	0,993	0,97	0,9822
2	R8R12R19R22	0,995	0,96	0,9688
3	R5R8R19R22	0,995	0,94	0,9694
4	R5R19L20R22	0,991	0,95	0,9658

5	L4K10L11	0,981	0,85	1
6	G4L5K10L11	0,981	0,92	0.9894

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 8-3. Predicción de la actividad hemolítica de los análogos prometedores

Efecto hemolítico				
N°	Péptidos	HAPPENN	DBAASP	VP
0	<i>Pictuseptina-1</i>	0,477	Active	0,64
1	K12K19K22	0,445	Not Active	0,70
2	R8R12R19R22	0,229	Not Active	0,85
3	R5R8R19R22	0,251	Not Active	0,80
4	R5R19L20R22	0,297	Not Active	0,85
5	L4K10L11	0,391	Not Active	0,54
6	G4L5K10L11	0,185	Not Active	0,54

Nota: VP (Valor predictivo).

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 9-3. Predicción de la estabilidad en solución

Estabilidad en solución			
N°	Péptidos	ProtParam	
0	<i>Pictuseptina-1</i>	Estable	11,11
1	K12K19K22	Estable	-4.33
2	R8R12R19R22	Estable	38,28
3	R5R8R19R22	Estable	26,87
4	R5R19L20R22	Estable	32,02
5	L4K10L11	Estable	-17,16
6	G4L5K10L11	Estable	-26,55

Realizado por: Yumbo, 2025.

Tabla 10-3. Predicción de actividades adicionales de los análogos: antifúngica y antiviral

N° secuencias	Péptido	AMPfun	META - iAVP
		Antifúngico	Antiviral
Original	<i>Pictuseptina-1</i>	0,5029	0,08
1	K12K19K22	0,8045	1
2	R8R12R19R22	0,6887	0,498
3	R5R8R19R22	0,6578	0,498
4	R5R19L20R22	0,6356	0,964
5	L4K10L11	0,7627	0,068
6	G4L5K10L11	0,7703	0,068

Realizado por: Yumbo, 2025.

Los análogos más prometedores fueron evaluados con herramientas predictivas como AMPfun y Meta-iAVP, utilizadas para determinar si presentan actividades adicionales, como acción antifúngica y antiviral. En este análisis, algunos análogos demostraron un potencial significativo en ambas actividades, destacándose como candidatos con propiedades biológicas mejoradas.

3.2. Modelo estructural

Los análogos prometedores fueron analizados mediante I-TASSER para determinar su estructura secundaria. Adicionalmente, se utilizó JPred4, herramienta que brindó mayor fiabilidad en la selección de los análogos al ofrecer resultados precisos sobre la formación de alfa-hélices. Sin embargo, para los análogos cortos L4K10L11 y G4L5K10L11, que contienen menos de 20 aminoácidos, no fue posible emplear JPred4. En su lugar, se utilizó PRABI, que generó gráficos detallados mostrando las regiones con mayor tendencia a formar alfa-hélices, proporcionando información valiosa para su evaluación estructural.

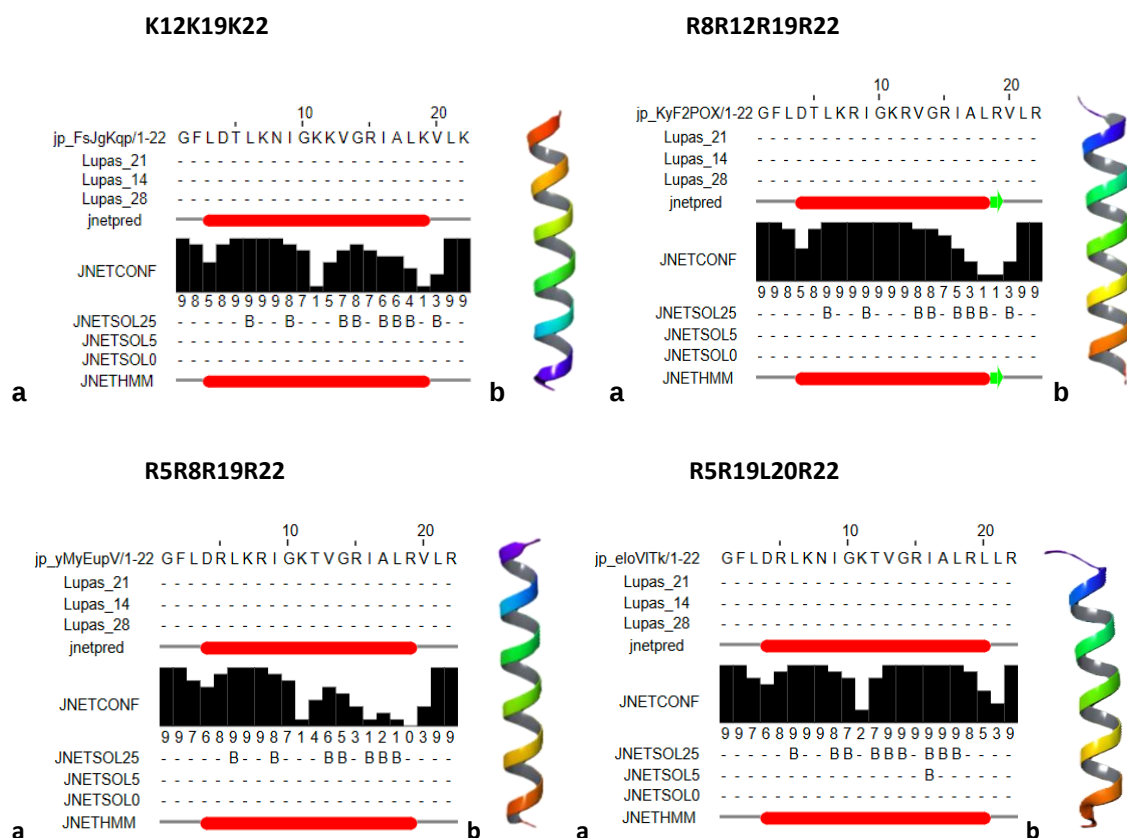


Figura 4-3. Predicción de estructura de análogos prometedores. Los análisis combinan predicciones de estructura secundaria con JPred4 (a) y modelos de estructura terciaria generados con I-TASSER (b) los cuales predicen la estructura secundaria de los mejores análogos. JPred 4 identifica regiones con alta confianza estructural, destacando hélices α y láminas β , mientras que I-TASSER visualiza estas predicciones en modelos tridimensionales, mostrando la disposición espacial de las estructuras. Este enfoque integral permite evaluar tanto la estabilidad estructural como el potencial funcional de los análogos.

Realizado por: Yumbo,2024.

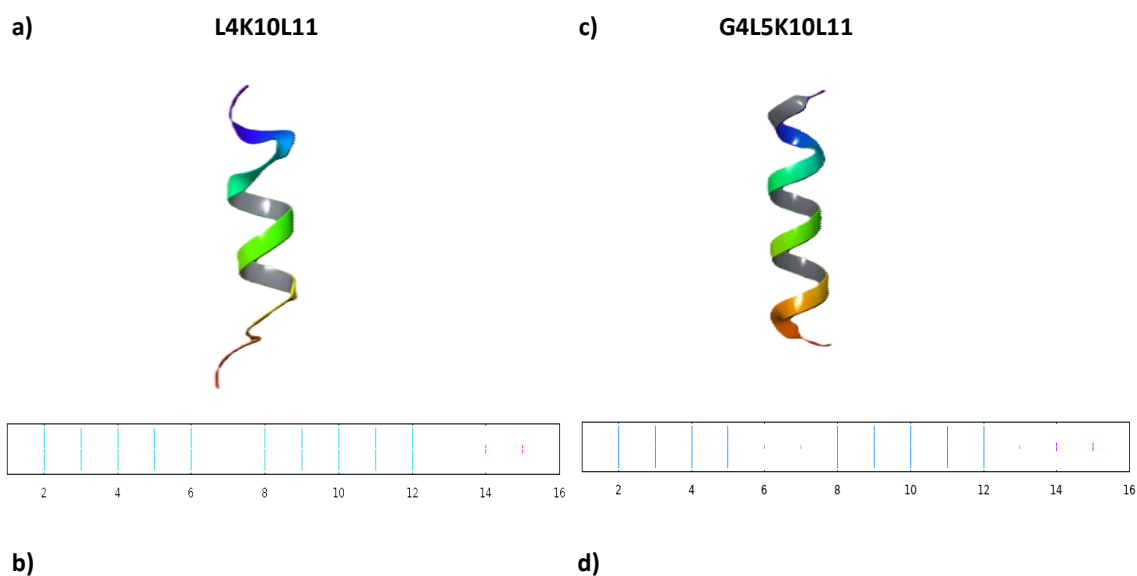


Figura 5-3. Predicción de estructura de análogos prometedores cortos. Las gráficas a y c corresponden a los modelos tridimensionales generados con I-TASSER, mostrando la orientación completa de los análogos, con el extremo N-terminal y el C-terminal en rojo, de los análogos cortos L4K10L11 Y G4L5K10L11. Por otro lado, las gráficas b y d fueron obtenidas con PRABI. La gráfica b muestra la predicción de estructuras secundarias, destacando una alta probabilidad de hélices alfa representadas en azul y láminas beta en verde.
Realizado por: Yumbo, 2025.

3.3. Acoplamiento molecular

3.3.1. Puntuación de los mejores acoplamientos

El análisis del acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando los seis análogos más prometedores identificados durante el proceso de cribado. Las simulaciones se realizaron entre la proteína fijadora de penicilina transglicosilasa 1b (código PDB: 3VMA), una membrana de bacteria Gram negativa generada mediante CHARMM-GUI y una membrana celular humana (código PDB: 2MLR). Este enfoque permitió evaluar de manera comparativa las interacciones moleculares entre los análogos seleccionados y las estructuras objetivo. En un análisis de acoplamiento, los valores más negativos de energía de interacción son importantes porque indican una mayor afinidad entre el ligando y el receptor, lo que sugiere interacciones más fuertes y estables que pueden reflejar un mejor potencial terapéutico y especificidad molecular.

Tabla 11-3. Puntuación de acoplamiento molecular. Interacciones de los mejores análogos – enzima 3VMA

Microorganismo	Enzima	Puntuación de acoplamiento (kcal/mol)		
		<i>Pictuseptina-1</i>	Análogos	Puntuación de acoplamiento
<i>Escherichia coli</i>	Proteína fijadora de penicilina transglicosilasa 1b Código PDB: 3VMA	-5,856 kcal/mol	K12K19K22	-6,915
			R8R12R19R22	-6,110
			R5R8R19R22	-5,870
			R5R19L20R22	-4,60
			L4K10L11	-5,381
			G4L5K10L11	-5,949

Realizado por: Yumbo, 2025.

La interacción entre el péptido y la proteína de membrana fue eficaz, ya que los resultados obtenidos mediante AutoDock Vina mostraron que los análogos K12K19K22, R8R12R19R22, R5R8R19R22 y G4L5K10L11 presentaban una mayor afinidad de interacción. Esto sugiere que es más probable que estos análogos inhiban el crecimiento bacteriano de *E. coli* debido a su capacidad para unirse a proteínas de membrana, lo que podría optimizar su efecto antimicrobiano. En particular, la enzima 3VMA es una metaloproteasa importante que interviene en varios procesos celulares de *E. coli*, como la degradación de proteínas y la regulación de la homeostasis celular. La unión de alta afinidad a esta enzima podría alterar su función, perjudicar la viabilidad bacteriana y aumentar el potencial antimicrobiano de los análogos ensayados (Sung et al., 2009).

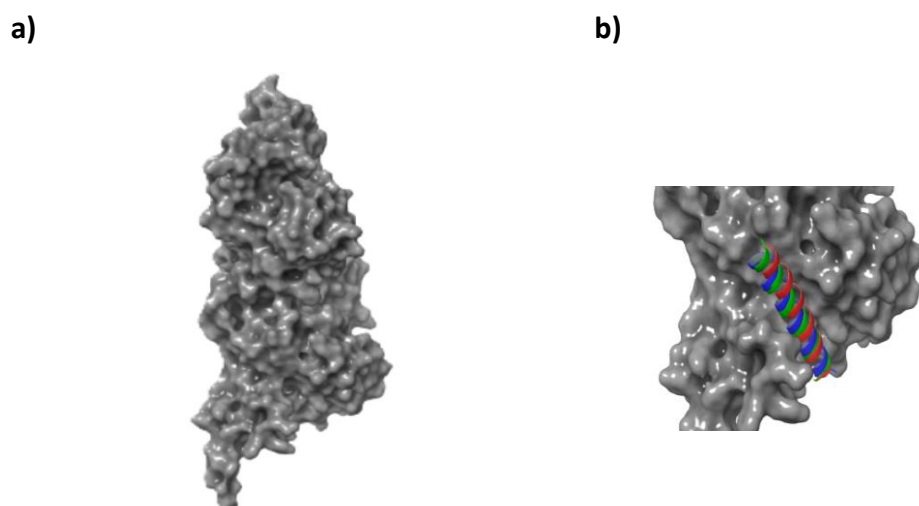


Figura 6-3. La figura muestra la interacción entre la enzima 3VMA y los análogos K12K19K22, R8R12R19R22 y R5R8R19R22. En a), se observa la superficie de la enzima. b), los péptidos están acoplados en el sitio activo: el análogo K12K19K22 en rojo, R8R12R19R22 en verde y R5R8R19R22 en azul, destacando sus orientaciones dentro del bolsillo de unión.

Realizado por: Yumbo, 2024.

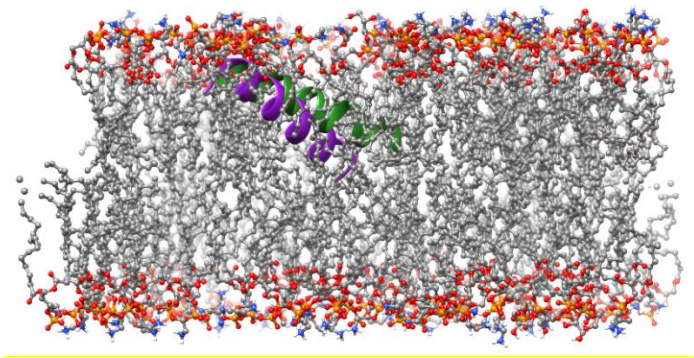
Tabla 12-3. Puntuación de acoplamiento molecular. Interacción de los mejores análogos - membrana Gram negativa

Membrana		Puntuación de docking (kcal/mol)		
		<i>Pictuseptina-1</i>	Análogos	Puntuación de acoplamiento
Membrana Gram negativa Archivo extraído de CHARM GUI		-6.662 kcal/mol	K12K19K22	-4,989
			R8R12R19R22	-6,731
			R5R8R19R22	-5,951
			R5R19L20R22	-6,797
			L4K10L11	-6,994
			G4L5K10L11	-7,38

Realizado por: Yumbo, 2025.

Pictuseptina-1 (control) obtuvo una puntuación de -6,662 kcal/mol, sirviendo como punto de comparación para evaluar las mejoras en los análogos. Entre estos, G4L5K10L11 1 mostró el mejor resultado con una puntuación de -7,138 kcal/mol, lo que indica una interacción más favorable con la membrana Gram negativa que *Pictuseptina-1*, probablemente debido a las modificaciones realizadas. Al igual R5R19L20R22 obtuvo -6,110 kcal/mol y L4K10L11 con -6,994 kcal/mol, también presentaron una ligera mejora en comparación con el péptido original. En cambio, los Análogos K12K19K22 y R5R8R19R22, obtuvieron puntuaciones más altas (menos negativas), sugiriendo que las modificaciones en estos no favorecieron significativamente la interacción con la membrana Gram negativa en comparación con *pictuseptina 1*.

a)



b)

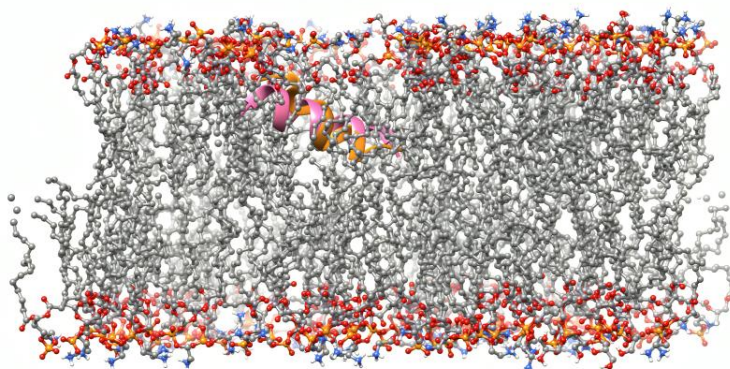


Figura 7-3. Interacción de los mejores análogos con la membrana Gramnegativa. a) Acoplamiento molecular de los análogos R8R12R19R22 (verde) y R5R19L20R22 (morado) con una membrana de bacterias Gram negativa extraída de CHARMM GUI. b) Interacción de los análogos cortos, L4K10L11 (naranja) y G4L5K10L11 (rosa) con la misma membrana. En ambos casos, todos los análogos muestran capacidad para penetrar la membrana bacteriana, destacando su potencial como agentes antimicrobianos.

Realizado por: Yumbo, 2024.

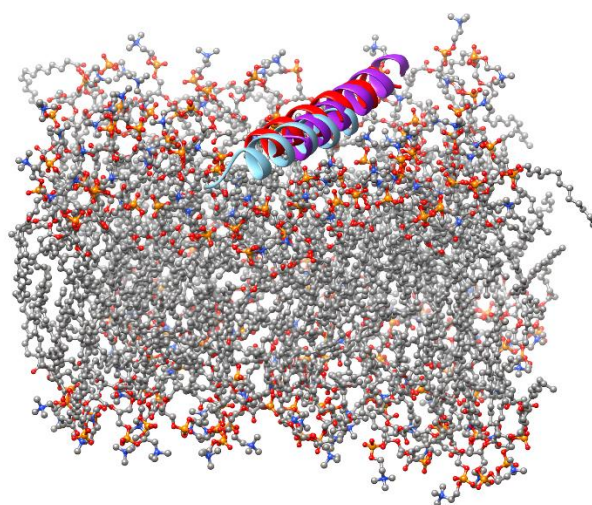
Tabla 13-3. Puntuación de acoplamiento molecular. Interacciones de los mejores análogos - membrana humana 2MLR.

Membrana		Puntuación de docking (kcal/mol)	
		<i>Pictuseptina-1</i>	Análogos
Membrana celular humana Código PDB:2MLR			Puntuación de acoplamiento
			K12K19K22
			-3,642
			R8R12R19R22
			-3,834
Membrana celular humana Código PDB:2MLR			R5R8R19R22
			-4,408
			R5R19L20R22
			-1,99
			L4K10L11
Membrana celular humana Código PDB:2MLR			-4,063
			G4L5K10L11
			-4,378

Realizado por: Yumbo, 2025.

Pictuseptina-1 mostró una afinidad de -4,094 kcal/mol. De los análogos, solo el Análogo 5 presentó una afinidad mayor (-4,378 kcal/mol), lo que sugiere que podría mantener o incluso aumentar el riesgo de hemólisis. Los demás análogos, al mostrar afinidades menores, cumplen parcialmente con el objetivo del diseño al reducir potencialmente la interacción con células humanas. El Análogo 4, con -1,99 kcal/mol, destaca como el menos afín y posiblemente más seguro, pero se requieren estudios adicionales para validar su efectividad y selectividad.

a)



b)

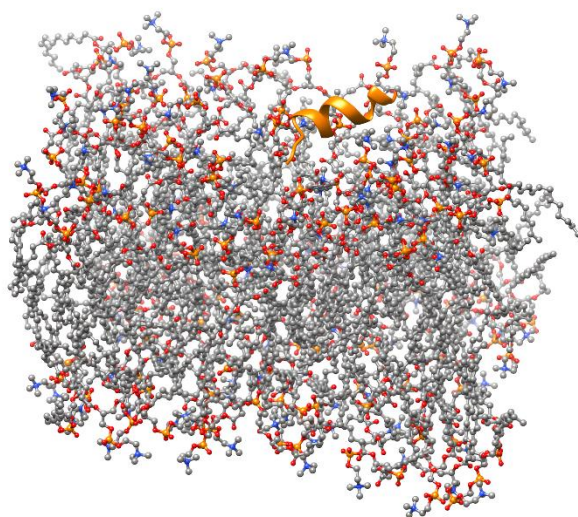


Figura 8-3. Acoplamiento de los mejores análogos con la membrana celular humana 2MLR. a) Acoplamiento molecular de los análogos, K12K19K22 (rojo), R8R12R19R22 (verde) y R5R19L20R22 (morado) con la membrana 2MLR. b) Interacción del análogo corto, L4K10L11 (naranja) con la misma membrana. En todos los casos, los análogos permanecen en la superficie de la membrana, lo que sugiere una baja actividad hemolítica.

Realizado por: Yumbo, 2025.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Estrategias de diseño

Los AMPs han surgido como alternativas potentes frente a los antibióticos, mostrando eficacia incluso contra cepas bacterianas multirresistentes (Chen et al., 2018; Van der Does et al., 2018). Sin embargo, los AMPs naturales presentan limitaciones como alta toxicidad, baja estabilidad química y física, tendencia a la agregación, corta vida media y rápida eliminación, lo que dificulta su aplicación clínica (Ying et al., 2019). Por ello, el diseño racional de AMPs es fundamental para mitigar estos problemas, potenciar su actividad antimicrobiana y reducir efectos adversos, abriendo camino hacia su uso terapéutico efectivo (Ying et al., 2019).

Para el diseño racional se emplearon tres estrategias. La primera consistió en la sustitución de aminoácidos en la cara polar y no polar del péptido, obteniendo 59 sustituciones en la cara polar y 30 en la cara no polar. En esta estrategia, los análogos en los que se reemplazaron aminoácidos hidrofílicos, como lisina y arginina, por aminoácidos neutros y básicos mostraron una mejora significativa en la actividad antimicrobiana.

Por otro lado, las sustituciones realizadas en la cara no polar, reemplazando aminoácidos hidrofóbicos por otros menos hidrofóbicos, como glicina, alanina y fenilalanina (Tabla 1-1), no generaron buenos resultados en términos de mejora de la actividad antimicrobiana. Esto se debe a que la *pictuseptina-1* tiene un valor de hidrofobicidad del 45,45%, mientras que la *cruzioseptina-4* tiene un valor de 52,17% de hidrofobicidad (Rengifo-Lema et al., 2024). Aunque ambos péptidos comparten ciertas similitudes en sus secuencias, las diferencias en la hidrofobicidad parecen ser determinantes en su interacción con las membranas. Es por ello que, a pesar de modificar la cara no polar por aminoácidos menos hidrofóbicos, no se obtuvieron buenos resultados en la actividad antimicrobiana. La disminución de la hidrofobicidad en esta región limita la capacidad de los péptidos para interactuar eficazmente con las membranas, lo que afecta su actividad biológica.

La segunda estrategia consistió en realizar un mapeo de actividad por truncamiento, en el que la secuencia peptídica de la *pictuseptina-1* fue procesada mediante el predictor CAMPR3. Esta herramienta permite mapear la secuencia y determinar la región antimicrobiana del péptido. Como resultado, se generaron dos análogos con probabilidades de 0,941 y 0,965, respectivamente. A estos análogos se les aplicó el mismo procedimiento de sustitución de aminoácidos en las caras polar y no polar, obteniendo 23 sustituciones en la cara polar y 17 en la cara no polar. Al someter estos análogos a los predictores, los de la cara polar presentaron una mayor probabilidad de ser antimicrobianos, mientras que los de la cara no polar mostraron resultados considerablemente más bajos, razón por las cuales fueron descartados. La eficacia del truncamiento como estrategia para optimizar péptidos antimicrobianos ha sido previamente demostrada en diversos estudios. Un ejemplo de ello es la investigación realizada por Zhou et al. (2019) demostró que, al truncar la *ranatuerina-2Pb* y generar los análogos *ranatuerina RPa* y *RPb*, se logró una mayor actividad antimicrobiana, además de una disminución de la citotoxicidad en células de mamíferos. Estos análogos también exhibieron una inhibición significativa del crecimiento de biopelículas de *Staphylococcus aureus* (Zhou et al., 2019).

La estrategia 3 consistió en la sustitución de aminoácidos en las caras polar y no polar de la *pictuseptina-1* y sus análogos truncados, generando 47 análogos. Esta modificación se hizo para optimizar la actividad antibacteriana, reducir la citotoxicidad y mejorar la estabilidad del péptido. La razón de esta sustitución se basa en la naturaleza anfipática de los péptidos antimicrobianos. La cara hidrofóbica facilita la inserción en la membrana bacteriana, mientras que la cara polar interactúa con las cargas superficiales de la membrana. Mejorar ambas caras optimiza la interacción con las membranas bacterianas, aumentando la actividad antimicrobiana y reduciendo la toxicidad hacia células de mamíferos (P. Wang et al., 2010).

4.2. Cribado de los análogos mediante herramientas predictivas

A partir de 123 análogos diseñados mediante tres estrategias, se realizaron cribados sucesivos para seleccionar los mejores candidatos según actividad antibacteriana, efecto hemolítico, tendencia a formar hélice alfa y estabilidad en solución. En el primer

cribado, se emplearon CAMPR3, AntiBP3 y AMPfun, con umbrales $\geq 0,98$; $\geq 0,90$ y $\geq 0,95$, respectivamente, seleccionando de esta manera a 70 análogos (Waghu et al., 2016b; Bajiya et al., 2024; Chung et al., 2020). La combinación de estas herramientas permitió una evaluación más precisa y robusta, minimizando falsos positivos. El segundo cribado evaluó el efecto hemolítico mediante HAPPENN (umbrales $\leq 0,45$) y DBAASP (análisis de actividad contra eritrocitos) (Pirtskhalava et al., 2021; Timmons & Hewage, 2020), y la formación de hélice alfa con PRABI y JPred4, seleccionando análogos con $\geq 70\%$ de tendencia a formar esta estructura (Kim et al., 2021; Sosa Pozo, 2024). Además, se analizó la estabilidad en solución con ProtParam, priorizando análogos con un índice de inestabilidad ≤ 40 (Garg et al., 2016). Tras aplicar estos filtros, se identificaron seis análogos finales con propiedades óptimas para estudios posteriores.

El uso de múltiples herramientas predictivas es importante, ya que cada algoritmo tiene fortalezas y limitaciones diferentes, lo que aumenta la fiabilidad de los resultados y permite una evaluación más precisa de la actividad antimicrobiana. Según un estudio de Wang et al. (2010), combinar varias plataformas predictivas mejora la exactitud y disminuye el riesgo de falsos positivos, proporcionando una evaluación más robusta de los potenciales péptidos antimicrobianos (P. Wang et al., 2010).

4.3. Características de los análogos prometedores

Los seis análogos prometedores (Tabla 6-3) mostraron un aumento en la cationicidad, que varió entre 3 y un máximo de 7, y una disminución en la hidrofobicidad de -0,02 a -0,27. Para la predicción de sus propiedades fisicoquímicas, como hidrofobicidad, cationicidad, punto isoelectrico (pI) y peso molecular, se empleó la herramienta AntiBP3. Utilizando herramientas predictivas, se determinó que estos análogos presentan una buena actividad antimicrobiana, un bajo efecto hemolítico, una conformación de hélice alfa superior al 70%, y estabilidad en solución (Bajiya et al., 2024).

Con respecto a la actividad antimicrobiana (Tabla 7-3), los seis análogos seleccionados demostraron propiedades significativamente mejoradas en comparación con el péptido original, que presentó valores de actividad de 0,922; 0,86 y 0,9588, según las predicciones obtenidas mediante CAMPR3, AntiBP3 y AMPfun respectivamente.

Aunque los seis análogos exhibieron buena actividad antimicrobiana, al ser evaluados con CAMPR3, los análogos K12K19K22, R8R12R19R22, R5R8R19R22, y R5R19L20R22 destacan por tener valores predictivos más cercanos a 1, lo que indica un alto índice de actividad antimicrobiana. Este patrón fue corroborado por AntiBP3, cuyos resultados también posicionaron a los mismos cuatro análogos como los más cercanos al valor óptimo de 1. Por otra parte, al analizar el análogo L4K10L11 (Tabla 7-3) con AMPfun, se obtuvo un valor predictivo de 1, indicando que este análogo posee un índice de actividad antimicrobiana destacado según este predictor. Aunque los otros cinco análogos también mostraron buenos resultados con AMPfun, ninguno alcanzó el valor máximo de 1. En el trabajo realizado por Bermúdez y colaboradores, quienes diseñaron análogos basados en CZS-1. De tres análogos con una predisposición antimicrobiana superior al 80%, solo K4K15 mostró una bioactividad superior al modelo original en ensayos *in vitro* (Bermúdez Puga, 2021). De manera similar, en el estudio realizado por Sosa, G. (2024), se generaron análogos inspirados en CZS-1 utilizando iAMPred como herramienta predictiva. Aunque varios alcanzaron valores máximos de 1, únicamente 21A4K15K18K demostró una mayor eficacia frente a *E. coli*, *C. albicans* y *K. pneumoniae* resistente a ampicilina durante los ensayos experimentales (Sosa Pozo, 2024). Lo cual evidencia que los valores obtenidos mediante los predictores, aunque valiosos, no aseguran un desempeño idéntico en pruebas *in vitro*. Por tanto, que un análogo no alcance el valor máximo en las herramientas predictivas no implica que carezca de actividad antimicrobiana significativa, ya que los resultados pueden variar en la parte experimental. Esto refuerza la necesidad de validar los datos computacionales mediante estudios prácticos (Sosa Pozo, 2024).

Del mismo modo, estudios previos respaldan la posibilidad de diseñar péptidos antimicrobianos que mantengan una alta actividad antibacteriana mientras exhiben una baja hemólisis. Por ejemplo, Guevara Agudelo (2017) diseñó y evaluó análogos de la catelicidina humana LL-37, los cuales mostraron actividad hemolítica insignificante incluso a concentraciones elevadas, destacando su potencial como agentes terapéuticos seguros (Guevara Agudelo, 2017). Asimismo, Chingaté S., y colaboradores (2023) sintetizaron análogos con actividad antimicrobiana y antituberculosa, encontrando que la mayoría presentaba porcentajes de hemólisis inferiores al 10% en las concentraciones evaluadas, lo que refuerza su seguridad hacia células humanas. Estos resultados son

coherentes con los obtenidos para los análogos R8R12R19R22, R5R8R19R22 y G4L5K10L11, los cuales, además de poseer actividad antimicrobiana, exhiben valores de hemólisis bajos según HAPPENN y fueron confirmados por DBAASP como no activos contra eritrocitos, reafirmando así su perfil de seguridad y potencial terapéutico. En el proceso de predicción de la estructura secundaria (Tabla 6-3), los análogos L4K10L11 y G4L5K10L11 destacan por presentar un porcentaje de hélice del 81,25%, según las predicciones realizadas por PRABI. Esta característica resulta particularmente relevante, ya que un mayor contenido de hélices alfa está asociado con una interacción más efectiva con la membrana bacteriana. La conformación helicoidal de los péptidos desempeña un papel crucial en el incremento de la actividad antimicrobiana, dado que favorece la formación de poros en la membrana bacteriana, lo que lleva a la desestabilización y eventual muerte de la célula patógena (Sánchez Acosta, 2016).

Los análogos K12K19K22 y LKNGLKTVGKLALNVL muestran estabilidad de -4,33 y -26,55, respectivamente (Tabla 7-3) predichos por ProtParam, los valores negativos que sugieren que estos análogos son más estables en solución, lo cual está relacionado con la helicidad del péptido. La estructura α -helicoidal es una conformación secundaria estable que puede mejorar la sensibilidad a la sal de los AMPs (Lanning & Fletcher, 2013). La hélice α proporciona rigidez a la cadena peptídica, lo que favorece su conformación general y mejora la estabilidad estructural. En el caso de la melitina, una estructura de hélice α altamente estable contribuye a su estabilidad general, pero también está asociada con una alta toxicidad (Xu et al., 2023). Por lo tanto, aunque la estructura α -helicoidal puede brindar estabilidad y mejorar el rendimiento de los AMP, su relación con la toxicidad debe considerarse cuidadosamente al diseñar nuevos análogos. Basado en el análisis realizado con el uso de diversas herramientas predictivas, se seleccionarán los 6 análogos más prometedores. Estos análogos han mostrado eficacia según los resultados obtenidos con las herramientas predictivas, y serán evaluados a través de estudios de acoplamiento molecular (Xu et al., 2023).

4.4. Actividades adicionales de los análogos prometedores

Además de evaluar la actividad antibacteriana de los seis análogos, se realizó la predicción de sus propiedades antifúngicas y antivirales (Tabla 10-3) con el propósito de

evaluar su posible capacidad para actuar contra diferentes tipos de patógenos y ampliar su espectro de acción. AMPfun, una herramienta especializada en la predicción de actividades antimicrobianas, resaltó la notable capacidad antifúngica de los análogos K12K19K22, L4K10L11 y G4L5K10L11, que obtuvieron valores significativos de 0,8045; 0,7627 y 0,7703, respectivamente. En contraste, la *pictuseptina-1* mostró una actividad antifúngica baja, con un valor de 0.5029. Sin embargo, las estrategias empleadas para mejorar los análogos permitieron superar el rendimiento del péptido original, logrando resultados más favorables. En el estudio realizado por Sosa (2024), los análogos diseñados lograron superar un valor de 0,980, demostrando así una notable actividad contra este patógeno (Sosa Pozo, 2024). En otra investigación experimental, se evaluó la actividad antifúngica contra *C. albicans*, con un resultado de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 54 a 64 μM , lo que indica una baja actividad de la *pictuseptina-1*. Este resultado concuerda con las predicciones de la herramienta, subrayando la importancia de las estrategias de mejora de los análogos para incrementar su eficacia contra *C. albicans* (Morán-Marcillo et al., 2022).

Por otro lado, la predicción antiviral realizada con MET-iAVP identificó dos análogos con alto potencial en esta categoría: K12K19K22 y R5R19L20R22, con puntuaciones de 1 y 0,964, respectivamente. Con respecto a la actividad del péptido original, se observó un claro aumento de los valores predictivos. Otros estudios resaltan la relevancia de los péptidos derivados de anfibios, como las *dermaseptinas S1-S5*, las cuales han sido probadas contra el VHS, demostrando una inhibición eficaz de la infectividad del virus (Belaid et al., 2002) con *dermaseptina-S4* que muestra potentes efectos contra las cepas de HSV-2 sensibles y resistentes al aciclovir ($\text{EC}_{50} \leq 6,0 \mu\text{M}$), pero también una alta citotoxicidad ($\text{LC}_{50} = 7,5 \mu\text{M}$) (Bergaoui et al., 2013). Se encontró que la *dermaseptina S1* es activa contra el virus del dengue (DENV) *in vitro* al interferir con el ciclo de replicación viral (Bergaoui et al., 2013).

4.5. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o más conocido con el término “molecular docking”, es una rama muy importante en el diseño computacional de fármacos y la bioinformática

(Zhang et al., 2022). En este estudio, se realizó acoplamiento rígido porque los péptidos helicoidales, aunque en ambientes acuosos adquieren estructura irregular, en ambientes de interacción con membranas adoptan conformación α -hélice definida (Xie et al., 2014). En este proceso, se ha utilizado MGLTools junto con el software AutoDock Vina, el cual ha sido empleado en otras investigaciones para realizar el acoplamiento molecular de péptidos antimicrobianos (Cuesta et al., 2021).

Los resultados del acoplamiento molecular (Tabla 11-3) realizados entre los análogos diseñados y la enzima Transglicosilasa PBP1b de *Escherichia coli* (código PDB: 3VMA) revelan una mejora en la interacción. Específicamente, *pictuseptina-1* presenta un valor de -5.856 kcal/mol, mientras que los análogos K12K19K22, R8R12R19R22, y R5R8R19R22 muestran valores de -6,915; -6,110 y -5,870 kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, los análogos R5R19L20R22, L4K10L11, y G4L5K10L11 presentaron valores menos negativos en comparación con el péptido original, lo que indica una interacción menos fuerte. El sitio de acoplamiento corresponde a las posiciones S358, K355, E233, E290, R286, N275 y Q271, que son los puntos donde se inserta el inhibidor moenomicina (Sung et al., 2009).

La moenomicina es un antibiótico natural producido por bacterias del género *Streptomyces* que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana al interferir con una enzima clave, la transglicosilasa (Rengifo-Lema et al., 2024). Esta enzima participa en la formación del peptidoglicano, un componente esencial de la pared celular en bacterias Gram positivas y, en menor medida, en Gram negativas (Sung et al., 2009). En un estudio realizado por Rengifo-Lema y colaboradores (2024), se investigó el acoplamiento del inhibidor moenomicina con la enzima PBP1b, obteniendo un valor de energía de acoplamiento de -7,3 kcal/mol. Asimismo, se llevó a cabo el acoplamiento entre la misma enzima y la *pictuseptina-1*, arrojando un valor de -6,6 kcal/mol (Rengifo-Lema et al., 2024b). A pesar de la diferencia en los resultados, las estrategias empleadas para el diseño de análogos basados en la *pictuseptina-1* mostraron resultados prometedores. Esto sugiere que los análogos diseñados mejoran la interacción con la enzima bacteriana, lo que podría ser crucial para su potencial inhibición.

En relación con el acoplamiento de los análogos prometedores a la membrana Gram negativa (Tabla 12-3), los análogos R8R12R19R22, R5R19L20R22, L4K10L11 y G4L5K10L11 presentaron valores de energía de acoplamiento de -6,731; -6,797; -6,994

y -7,138 kcal/mol, respectivamente. Estos resultados superan al obtenido con la pictuseptina 1, que mostró un valor de -6,662 kcal/mol, indicando una interacción más fuerte con la membrana Gram negativa. En contraste, el resto de los análogos mostraron valores que reflejan una menor afinidad en comparación con el péptido original. Sosa, G. (2024), realizó el acoplamiento entre los análogos diseñados basados en la CZS-1 con la membrana 2W6D, y obtuvo valores de -3,889 y -4,884, mientras que CZS-1 dio un valor de -0,8758 (Sosa, 2024). Estos análogos diseñados pese a su baja afinidad se insertaron dentro de la membrana bacteriana, lo cual fue corroborado de manera in-silico y experimentalmente frente a bacterias *E. coli*, *C. albicans* y *K. pneumoniae* resistente a ampicilina. Al comparar pictuseptina 1 y CZS-1, hay una mayor actividad por parte de la *pictuseptina-1*, esto se debe a la estructura alfa hélice, en el caso de la *pictuseptina* posee un porcentaje de 68,18% mientras que la de CZS-1 posee 47, 62 % (Sosa Pozo, 2024). Por ende, se toma en cuenta que la helicidad de un péptido es crucial ya que proporciona una estructura estable y definida que facilita interacciones específicas con el receptor. Además, los péptidos helicoidales, especialmente los anfipáticos, interactúan mejor con las membranas celulares, lo que es fundamental para la creación de nuevos agentes antimicrobianos (Sánchez Acosta, 2016).

Por otro lado, también se realizó el acoplamiento entre los análogos diseñados y la membrana celular humana (código: 2MLR), obteniendo los siguientes resultados de afinidad para los análogos K12K19K22, R8R12R19R22, R5R19L20R22 y L4K10L11: -3,42; -3,834; -1,99 y -4,063, respectivamente. Estos valores sugieren un bajo efecto hemolítico frente a células humanas, lo cual es crucial para la viabilidad de estos péptidos en aplicaciones clínicas. Además, es importante destacar el análogo con el valor de afinidad más bajo, -1,99, ya que sugiere que, aunque su afinidad con la membrana celular humana es moderada, no debería ser tóxico para las células humanas. Esto podría implicar que este análogo tiene un gran potencial para ser altamente activo contra patógenos, con un perfil de seguridad adecuado para su uso terapéutico. Los resultados de acoplamiento realizados por Sosa, G. (2024), en cuanto al acompañamiento con la misma célula humana fueron de 21A4K15K18K y 2L15K, con valores de -3,97 y -4,131 (Sosa Pozo, 2024). Asimismo, se corroboró que **la pictuseptina-1**, en ensayos experimentales, mostró un alto porcentaje de hemólisis (1-29%) (Morán-Marcillo et al., 2022), lo que sugiere que las estrategias de diseño empleadas en los

análogos ayudaron a reducir significativamente el efecto hemolítico, mejorando su perfil de seguridad en comparación con la pictuseptina original.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El diseño racional de péptidos antimicrobianos basado en *pictuseptina-1* (PTS-1) permitió generar análogos con propiedades fisicoquímicas y estructurales optimizadas a través de tres estrategias principales. La primera estrategia consistió en modificaciones individuales centradas en el lado polar y no polar del péptido. Las modificaciones en el lado polar dieron lugar a 59 análogos, mientras que en el lado no polar se generaron 30. En la segunda estrategia, se utilizó el mapeo de la actividad de truncamiento con la herramienta CAMPR3 para identificar las regiones clave responsables de la actividad antimicrobiana. Se obtuvieron así dos secuencias cortas con valores de 0,941 y 0.965, que luego se modificaron en ambas caras. De este modo, se obtuvieron 23 análogos en la cara polar y 17 en la no polar. La tercera estrategia implicó modificaciones simultáneas en las caras polar y apolar, con el objetivo de generar análogos anfipáticos que mantuvieran un equilibrio entre ambas regiones, mejorando así su estabilidad. Esta estrategia produjo 47 análogos. En total, las tres estrategias generaron 123 análogos, cuya actividad antimicrobiana, potencial hemolítico, estructura alfa-hélice bien definida y estabilidad en solución acuosa se sometieron a prueba. Estas pruebas condujeron a la identificación de seis análogos prometedores. Estos análogos presentaban propiedades fisicoquímicas mejoradas, incluido un aumento de la carga positiva de +3 a +7, una disminución de la hidrofobicidad de -0,02 a -0,27 y una mayor tendencia a formar estructuras α -helicoidales, con valores que oscilaban entre el 68,18% y el 81,25%. También mostraron estabilidad en solución, con valores que oscilaron entre 38,28 y -26,55. Estas mejoras se tradujeron en una mayor actividad antimicrobiana, una menor citotoxicidad y una mayor estabilidad.

Las herramientas bioinformáticas fueron esenciales para predecir y evaluar el impacto de estas modificaciones, identificando los análogos más prometedores. El acoplamiento molecular de los 6 análogos modificados con la enzima 3VMA permitió identificar al análogo con mayor afinidad, siendo K12K19K22, que mostró una energía de unión de -6,915 kcal/mol. De manera similar, en la interacción con la membrana de bacterias Gram negativas, el análogo G4L5K10L11 obtuvo una energía de unión de -7,138 kcal/mol, lo

que indica una fuerte interacción con dicha membrana. Por otro lado, en el acoplamiento con la membrana celular humana (2MLR), el análogo más destacado fue R5R19L20R22, con una energía de unión de -1,99 kcal/mol, lo que sugiere que este péptido presenta baja toxicidad hacia células humanas y podría ser un candidato prometedor como antibiótico terapéutico. El enfoque principal de la investigación fue diseñar análogos con mayor actividad antimicrobiana, menor efecto hemolítico y con estructuras estables, esto a través del análisis de herramientas bioinformáticas, por ende, se recomienda realizar dinámica molecular con la finalidad de analizar a detalle la interacción de dichos análogos contra distintas enzimas y membranas bacterianas. Además, se recomienda llevar a cabo ensayos de concentración mínima inhibitoria y hemólisis con los análogos diseñados para corroborar su potencial antimicrobiano y citotóxico.

REFERENCIAS

- Årdal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outtersson, K., Rex, J. H., & Sumpradit, N. (2020). Antibiotic development—Economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(5), 267-274. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>
- Azmi, F., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2016). Towards the Development of Synthetic Antibiotics: Designs Inspired by Natural Antimicrobial Peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 23(41), 4610-4624. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160825162435>
- 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*, 13(2), 168. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020168>
- Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M., & Hani, K. (2002). In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of Medical Virology*, 66(2), 229-234. <https://doi.org/10.1002/jmv.2134>
- Bergaoui, I., Zairi, A., Tangy, F., Aouni, M., Selmi, B., & Hani, K. (2013). In vitro antiviral activity of dermaseptin S(4) and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. *Journal of Medical Virology*, 85(2), 272-281. <https://doi.org/10.1002/jmv.23450>
- Bermúdez Puga, S. A. (2021). *Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Cruzioseptina*-. Universidad Regional Amazónica Ikiam.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Bissantz C, Folkers G, Rognan D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem* [Internet]. 2000;43(25):4759–67. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jm001044l>
- Caveney, N. A., Workman, S. D., Yan, R., Atkinson, C. E., Yu, Z., & Strynadka, N. C. J. (2021). CryoEM structure of the antibacterial target PBP1b at 3.3 Å resolution. *Nature Communications*, 12(1), 2775. doi:10.1038/s41467-021-23063-6
- Chen, H., Wubbolts, R. W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2018). Inhibition and Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Host Defence Peptides. *Scientific Reports*, 8(1), 10446. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28842-8>
- 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*, bbz043. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz043>
- Chung, C.-R., Kuo, T.-R., Wu, L.-C., Lee, T.-Y., & Horng, J.-T. (2020). Characterization and identification of antimicrobial peptides with different functional activities. *Briefings in Bioinformatics*, 21(3),

- 1098-1114. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz043>
- 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, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*, 53(6), 853-868. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-02986-w>
- Deslouches, B., Montelaro, R. C., Urish, K. L., & Di, Y. P. (2020). Engineered Cationic Antimicrobial Peptides (eCAPs) to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Pharmaceutics*, 12(6), 501. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060501>
- 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>
- Garg, V. K., Avashthi, H., Tiwari, A., Jain, P. A., Ramkete, P. W., Kayastha, A. M., & Singh, V. K. (2016). MFPP1 - Multi FASTA ProtParam Interface. *Bioinformation*, 12(2), 74-77. <https://doi.org/10.6026/97320630012074>
- Gazit, E. (2007). Self-assembled peptide nanostructures: The design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews*, 36(8), 1263. <https://doi.org/10.1039/b605536m>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129-136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- González García, M., San Juan Galán, J., Morales Vicente, F. E., & Otero González, A. J. (2017). Péptidos antimicrobianos: Potencialidades terapéuticas. *Rev. cuba. med. trop*, 1-13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000200008
- Guevara Agudelo, F. A. (2017). *Evaluación de la actividad antibiopelícula de péptidos sintéticos análogos a catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de Staphylococcus spp. En Bogotá Colombia*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59583>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Hendlich M. Databases for Protein–Ligand Complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* [Internet]. 1998 [citado el 25 de febrero de 2025];54(6):1178–82. Disponible en: <https://journals.iucr.org/d/issues/1998/06/01/ba0006/index.html>

- Hof, W. V. T., Veerman, E. C. I., Helmerhorst, E. J., & Amerongen, A. V. N. (2001). Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Biological Chemistry*, 382(4). <https://doi.org/10.1515/BC.2001.072>
- Hou, S., Liu, Z., Young, A. W., Mark, S. L., Kallenbach, N. R., & Ren, D. (2010). Effects of Trp- and Arg-Containing Antimicrobial-Peptide Structure on Inhibition of Escherichia coli Planktonic Growth and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1967-1974. <https://doi.org/10.1128/AEM.02321-09>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Huerta-Cantillo, J., & Navarro-García, F. (2016). *Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells*.
- Ji, S., An, F., Zhang, T., Lou, M., Guo, J., Liu, K., Zhu, Y., Wu, J., & Wu, R. (2024). Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116072. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116072>
- Kim, A. K., Looger, L. L., & Porter, L. L. (2021). A high-throughput predictive method for sequence-similar fold switchers. *Biopolymers*, 112(10), e23416. <https://doi.org/10.1002/bip.23416>
- Kumar, E. A., Yuan, Z., Palermo, N. Y., Dong, L., Ahmad, G., Lokesh, G. L., Kolar, C., Kizhake, S., Borgstahl, G. E. O., Band, H., & Natarajan, A. (2012). Peptide truncation leads to a twist and an unusual increase in affinity for casitas B-lineage lymphoma tyrosine kinase binding domain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(7), 3583-3587. <https://doi.org/10.1021/jm300078z>
- OMS.(2024). *Bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*. Recuperado 27 de enero de 2025, de <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- OPS/OMS. (2024). *Resistencia antibacteriana*. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
- Lai, Z., Yuan, X., Chen, H., Zhu, Y., Dong, N., & Shan, A. (2022). Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability. *Biotechnology Advances*, 59, 107962. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107962>
- Lanning, M., & Fletcher, S. (2013). Recapitulating the α -Helix: Nonpeptidic, Low-Molecular-Weight Ligands for the Modulation of Helix-Mediated Protein–Protein Interactions. *Future Medicinal Chemistry*, 5(18), 2157-2174. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.176>
- Lee, Y.-C. J., Shirkey, J. D., Park, J., Bisht, K., & Cowan, A. J. (2022). An Overview of Antiviral Peptides and Rational Biodesign Considerations. *BioDesign Research*, 2022, 9898241. <https://doi.org/10.34133/2022/9898241>
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919-3931.
- Li, T., Liu, Q., Wang, D., & Li, J. (2019). Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new

- antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 881-888. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.015>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 194.
- Martínez, M. M. B. (2020). *Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación in vitro e in vivo. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en Galleria mellonella*. <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2583>
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V., & Rao, A. R. (2017). Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Scientific Reports*, 7(1), 42362. <https://doi.org/10.1038/srep42362>
- Melittin: From honeybees to superbugs | Applied Microbiology and Biotechnology*. (s. f.). Recuperado 7 de enero de 2025, de <https://link.springer.com/article/10.1007/S00253-019-09698-Y>
- Morán-Marcillo, G., Sánchez Hinojosa, V., de los Monteros-Silva, N. E., Blasco-Zúñiga, A., Rivera, M., Naranjo, R. E., Almeida, J. R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., Shaw, C., & Proaño-Bolaños, C. (2022). Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi treefrog, *Boana picturata*. *Journal of Proteomics*, 264, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104633>
- Morehead, M. S., & Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(3), 467-484. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.006>
- Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, M. D. C., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta Médica de México*, 154(6), 762. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>
- Pathak, S., & Chauhan, V. S. (2011). Rationale-based, de novo design of dehydrophenylalanine-containing antibiotic peptides and systematic modification in sequence for enhanced potency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2178-2188. <https://doi.org/10.1128/AAC.01493-10>
- 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., Irazazabal, L., Alves, E. S. F., Ribeiro, S. M., Matos, C. O., Pires, Á. S., Fensterseifer, I. C. M., Miranda, V. J., Haney, E. F., Humblot, V., Torres, M. D. T., Hancock, R. E. W., Liao, L. M., Ladram, A., Lu, T. K., de la Fuente-Nunez, C., & Franco, O. L. (2018). In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design. *Nature Communications*, 9(1), 1490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03746-3>
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>
- Pukala, T. L., Bowie, J. H., Maselli, V. M., Musgrave, I. F., & Tyler, M. J. (2006). Host-defence peptides from

- the glandular secretions of amphibians: Structure and activity. *Natural Product Reports*, 23(3), 368-393. <https://doi.org/10.1039/B512118N>
- Rengifo-Lema, M. J., Proaño-Bolaños, C., Cuesta, S., & Meneses, L. (2024a). Computational modelling of the antimicrobial peptides Cruzioseptin-4 extracted from the frog *Cruziohyla calcarifer* and Pictuseptin-1 extracted from the frog *Boana picturata*. *Scientific Reports*, 14(1), 4805. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55171-w>
- Rengifo-Lema, M. J., Proaño-Bolaños, C., Cuesta, S., & Meneses, L. (2024b). Computational modelling of the antimicrobial peptides Cruzioseptin-4 extracted from the frog *Cruziohyla calcarifer* and Pictuseptin-1 extracted from the frog *Boana picturata*. *Scientific Reports*, 14(1), 4805. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55171-w>
- Rinaldi, A. C. (2002). Antimicrobial peptides from amphibian skin: An expanding scenario: Commentary. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 799-804. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00401-5](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00401-5)
- Sánchez Acosta, Y. A. (2016). *Diseño de péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55719>
- Sharma P, Ayappa KG. A molecular dynamics study of antimicrobial peptide interactions with the lipopolysaccharides of the outer bacterial membrane. *J Membr Biol* [Internet]. 2022;255(6):665–75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-022-00258-6>
- Self-assembly of antimicrobial peptoids impacts their biological effects on ESKAPE bacterial pathogens—PMC.* (s. f.). Recuperado 6 de mayo de 2024, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8962514/>
- Sosa Pozo, G. F. (2024). *ESTRATEGIAS DE DISEÑO RACIONAL DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS INSPIRADOS EN CRUZIOSEPTINA-1*.
- Sung, M.-T., Lai, Y.-T., Huang, C.-Y., Chou, L.-Y., Shih, H.-W., Cheng, W.-C., Wong, C.-H., & Ma, C. (2009). Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8824-8829. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904030106>
- 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>
- Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019a). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547-3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>
- Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019b). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547-3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new

- scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. doi:10.1002/jcc.21334
- van der Does, A. M., Amatngalim, G. D., Keijser, B., Hiemstra, P. S., & Villenave, R. (2018). Contribution of Host Defence Proteins and Peptides to Host-Microbiota Interactions in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Vaccines*, 6(3), 49. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030049>
- 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), D1094-1097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>
- Wang, G., Vaisman, I. I., & van Hoek, M. L. (2022). Machine learning prediction of antimicrobial peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2405, 1–37. doi:10.1007/978-1-0716-1855-4_1
- Wang, J., Chou, S., Xu, L., Zhu, X., Dong, N., Shan, A., & Chen, Z. (2015). High specific selectivity and Membrane-Active Mechanism of the synthetic centrosymmetric α -helical peptides with Gly-Gly pairs. *Scientific Reports*, 5(1), 15963. <https://doi.org/10.1038/srep15963>
- Wang, P., Nan, Y. H., Yang, S.-T., Kang, S. W., Kim, Y., Park, I.-S., Hahm, K.-S., & Shin, S. Y. (2010). Cell selectivity and anti-inflammatory activity of a Leu/Lys-rich α -helical model antimicrobial peptide and its diastereomeric peptides. *Peptides*, 31(7), 1251-1261. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.03.032>
- Wu, S., & Zhang, Y. (2007). LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3375–3382. doi:10.1093/nar/gkm251
- Xie, J., Gou, Y., Zhao, Q., Wang, K., Yang, X., Yan, J., Zhang, W., Zhang, B., Ma, C., & Wang, R. (2014). Antimicrobial activities and membrane-active mechanism of CPF-C1 against multidrug-resistant bacteria, a novel antimicrobial peptide derived from skin secretions of the tetraploid frog *Xenopus clivii*. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 20(11), 876-884. <https://doi.org/10.1002/psc.2679>
- Xu, S., Tan, P., Tang, Q., Wang, T., Ding, Y., Fu, H., Zhang, Y., Zhou, C., Song, M., Tang, Q., Sun, Z., & Ma, X. (2023). Enhancing the stability of antimicrobial peptides: From design strategies to applications. *Chemical Engineering Journal*, 475, 145923. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145923>
- Ying, Y., Wang, H., Xi, X., Ma, C., Liu, Y., Zhou, M., Du, Q., Burrows, J. F., Wei, M., Chen, T., & Wang, L. (2019). Design of N-Terminal Derivatives from a Novel Dermaseptin Exhibiting Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Biomolecules*, 9(11), 646. <https://doi.org/10.3390/biom9110646>
- Zhang, B., Li, H., Yu, K., & Jin, Z. (2022). Molecular docking-based computational platform for high-throughput virtual screening. *Ccf Transactions on High Performance Computing*, 4(1), 63-74. <https://doi.org/10.1007/s42514-021-00086-5>
- Zhang Q-Y, Yan Z-B, Meng Y-M, Hong X-Y, Shao G, Ma J-J, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil Med Res* [Internet]. 2021;8(1). Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>

- Zhou, J., Liu, Y., Shen, T., Chen, L., Zhang, C., Cai, K., Liu, Z., Meng, X., Zhang, L., Liao, C., & Wang, C. (2019). Enhancing the antibacterial activity of PMAP-37 by increasing its hydrophobicity. *Chemical Biology & Drug Design*, 94(5), 1986-1999. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13601>
- Zhou, X., Shi, D., Zhong, R., Ye, Z., Ma, C., Zhou, M., Xi, X., Wang, L., Chen, T., & Kwok, H. F. (2019). Bioevaluation of Ranatuerin-2Pb from the Frog Skin Secretion of *Rana pipiens* and Its Truncated Analogues. *Biomolecules*, 9(6), 249. <https://doi.org/10.3390/biom9060249>

ANEXOS

Glosario de Anexos

HD: hidrofobicidad

C: carga

pI: punto isoeléctrico

PM: peso molecular

AB: actividad antibacteriana

HM: hemólisis

A/NA: activo/ no activo

VP: valor predictivo

α H: alfa hélice

E/NE: estable/ no estable

IE: índice de estabilidad

Biblioteca de análogos de la Estrategia 1

Cara polar

Anexo 1. Análogos generados para el aumento de la cationicidad.

Nº	Asignación	Secuencias	HD	C	pI	PM
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.02	2	10.01	2344.15
1	k5	GFLDKLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.06	3	10.3	2371.22
2	k8	GFLDTLKKIGKTVGRIALNVLT	-0.04	3	10.3	2358.22
3	k12	GFLDTLKNIGKKVGRIALNVLT	-0.06	3	10.3	2371.22
4	k20	GFLDTLKNIGKTVGRIALKVLT	-0.04	3	10.3	2358.22
5	k22	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLK	-0.06	3	10.3	2371.22
6	R5	GFLDRLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.09	3	11.01	2399.23
7	R8	GFLDTLKRIGKTVGRIALNVLT	-0.07	3	11.01	2386.23
8	R12	GFLDTLKNIGKRVGRIALNVLT	-0.09	3	11.01	2399.23
9	R20	GFLDTLKNIGKTVGRIALRVLT	-0.07	3	11.01	2386.23
10	R22	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLR	-0.09	3	11.01	2399.23
11	K5K8	GFLDKLKKIGKTVGRIALNVLT	-0.09	4	10.47	2385.29
12	K8K12	GFLDTLKKIGKKVGRIALNVLT	-0.09	4	10.47	2385.29
13	K12K19	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLT	-0.09	4	10.47	2385.29
14	K19K22	GFLDTLKNIGKTVGRIALKVLK	-0.09	4	10.47	2385.29
15	K5K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALNVLK	-0.11	4	10.47	2398.29
16	R5R8	GFLDRLKRIGKTVGRIALNVLT	-0.15	4	11.73	2441.31

17	R8R12	GFLDTLKRIGKRVGRIALNVLT	-0.15	4	11.73	2441.31
18	R12R19	GFLDTLKNIGKRVGRIALRVLT	-0.15	4	11.73	2441.31
19	R19R22	GFLDTLKNIGKTVGRIALRVLR	-0.15	4	11.73	2441.31
20	R5R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALNVLR	-0.17	4	11.73	2454.31
21	K5K8K12	GFLDKLKKIGKKVGRIALNVLT	-0.13	5	10.59	2412.36
22	K8K12K19	GFLDTLKKIGKKVGRIALKVLT	-0.11	5	10.59	2399.36
23	K12K19K22	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLK	-0.13	5	10.59	2412.36
24	K5K19K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALKVLK	-0.13	5	10.59	2412.36
25	K5K12K22	GFLDKLKNIGKKVGRIALNVLK	-0.15	5	10.59	2425.36
26	R5R8R12	GFLDRLKRIGKRVGRIALNVLT	-0.22	5	12.01	2496.39
27	R8R12R19	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLT	-0.2	5	12.01	2483.39
28	R12R19R22	GFLDTLKNIGKRVGRIALRVLR	-0.22	5	12.01	2496.39
29	R5R19R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRVLR	-0.22	5	12.01	2496.39
30	R5R12R22	GFLDRLKNIGKRVGRIALNVLR	-0.24	5	12.01	2509.39
31	K5K8K12K19	GFLDKLKKIGKKVGRIALKVLT	-0.15	6	10.68	2426.43
32	K8K12K19K22	GFLDTLKKIGKKVGRIALKVLK	-0.15	6	10.68	2426.43
33	K5K12K19K22	GFLDKLKNIGKKVGRIALKVLK	-0.17	6	10.68	2439.43
34	K5K8K19K22	GFLDKLKKIGKTVGRIALKVLK	-0.15	6	10.68	2426.43
35	K5K8K12K22	GFLDKLKKIGKKVGRIALNVLK	-0.17	6	10.68	2439.43
36	R5R8R12R19	GFLDRLKRIGKRVGRIALKVLT	-0.24	6	12.02	2510.46
37	R8R12R19R22	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLR	-0.27	6	12.19	2538.47
38	R5R12R19R22	GFLDRLKNIGKRVGRIALRVLR	-0.29	6	12.19	2551.47
39	R5R8R19R22	GFLDRLKRIGKTVGRIALRVLR	-0.27	6	12.19	2538.47
40	R5R8R12R22	GFLDRLKRIGKRVGRIALNVLR	-0.29	6	12.19	2551.47
41	K5R8	GFLDKLKRIGKTVGRIALNVLT	-0.12	4	11.1	2413.3
42	K8R12	GFLDTLKKIGKRVGRIALNVLT	-0.12	4	11.1	2413.3
43	K12R19	GFLDTLKNIGKKVGRIALRVLT	-0.12	4	11.1	2413.3
44	K19R22	GFLDTLKNIGKTVGRIALKVLR	-0.12	4	11.1	2413.3
45	K5R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALNVLK	-0.14	4	11.1	2426.3
46	K5R8K12	GFLDKLKRIGKKVGRIALNVLT	-0.16	5	11.17	2440.37
47	K8R12R19	GFLDTLKKIGKRVGRIALRVLT	-0.17	5	11.74	2455.38
48	K12K19R22	GFLDKLKNIGKKVGRIALRVLT	-0.16	5	11.17	2440.37

49	R5K19R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALKVLR	-0.19	5	11.74	2468.38
50	R5K12K22	GFLDRLKNIGKKVGRIALNVLK	-0.18	5	11.17	2453.37
51	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	-0.21	6	11.75	2482.45
52	K8R12R19K22	GFLDTLKKIGKRVGRIALRVLK	-0.21	6	11.75	2482.45
53	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	-0.21	6	11.75	2482.45
54	R5K12K19R22	GFLDRLKNIGKKVGRIALKVLR	-0.23	6	11.75	2495.45
55	R5R8K12K22	GFLDRLKRIGKKVGRIALNVLK	-0.23	6	11.75	2495.45
56	R4K8K12K19	GFLRTLKKIGKKVGRIALKVLT	-0.15	7	12.04	2440.46
57	R4R8R12R19	GFLRTLKRIGKRVGRIALRVLT	-0.24	7	12.61	2524.49
58	R4K8R12R22	GFLRTLKKIGKRVGRIALNVLR	-0.23	7	12.49	2509.48
59	R4K8K12R19R22	GFLRTLKKIGKKVGRIALRVLR	-0.26	8	12.49	2523.55

Cara no polar

Anexo 2. Análogos generados para la disminución de la hidrofobicidad

N°	Asignación	Secuencias	HD	C	pl	PM
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.02	2	10.01	2344.15
1	A9	GFLDTLKNAGKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2302.06
2	A9A16	GFLDTLKNAGKTVGRAALNVLT	-0.07	2	10.01	2259.97
3	A1	AFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.02	2	10.01	2358.17
4	A2	GALDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2268.05
5	A3	GFADTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2302.06
6	A6	GFLDTAKNIGKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2302.06
7	A10	GFLDTLKNIAKTVGRIALNVLT	-0.02	2	10.01	2358.17
8	A13	GFLDTLKNIGKTAGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2316.09
9	A14	GFLDTLKNIGKTVARIALNVLT	-0.02	2	10.01	2358.17
10	A18	GFLDTLKNIGKTVGRIAANVLT	-0.04	2	10.01	2302.06
11	A20	GFLDTLKNIGKTVGRIALNALT	-0.04	2	10.01	2316.09
12	A21	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVAT	-0.04	2	10.01	2302.06
13	A1A2	AALDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2282.07
14	A3A6	GFADTAKNIGKTVGRIALNVLT	-0.05	2	10.01	2259.97
15	A9A10	GFLDTLKNAAKTVGRIALNVLT	-0.04	2	10.01	2316.08

16	A13A14	GFLDTLKNIGKTAARIALNVLT	-0.03	2	10.01	2330.11
17	A18A20	GFLDTLKNIGKTVGRIAANALT	-0.05	2	10.01	2274
18	A1A21	AFLDTLKNIGKTVGRIALNVAT	-0.03	2	10.01	2316.08
19	A2A21	GALDTLKNIGKTVGRIALNVAT	-0.05	2	10.01	2225.96
20	A3A20	GFADTLKNIGKTVGRIALNALT	-0.05	2	10.01	2274
21	A6A18	GFLDTAKNIGKTVGRIAANVLT	-0.05	2	10.01	2259.97
22	A6A9A16	GFLDTLKNAGKTVGRAALNVLT	-0.07	2	10.01	2259.97
23	A9A13	GFLDTLKNAGKTAGRIALNVLT	-0.06	2	10.01	2274
24	A13A16	GFLDTLKNIGKTAGRAALNVLT	-0.07	2	10.01	2216.93
25	A9A20	GFLDTLKNAGKTVGRIALNALT	-0.06	2	10.01	2274
26	A13A19	GFLDTLKNIGKTAGRIALNALT	-0.05	2	10.01	2288.03
27	A9A13A16	GFLDTLKNAGKTAGRAALNVLT	-0.08	2	10.01	2231.91
28	A6A20A21	GFLDTAKNIGKTVGRIALNAAT	-0.06	2	10.01	2231.91
29	A3A6A9	GFADTAKNAGKTVGRIALNVLT	-0.07	2	10.01	2217.88
30	A10A14A20	GFLDTLKNIAKTVARIALNALT	-0.03	2	10.01	2344.13

Biblioteca de análogos Estrategia 2

Anexo 3. Mapeo de actividad por truncamiento realizado en CAMPR3

N°	Secuencias	AMP/ No AMP	Probabilidad
1	TLKNIGKTVGRIA	NAMP	0.416
2	LKNIGKTVGRIAL	AMP	0.841
3	KNIGKTVGRIALN	NAMP	0.277
4	NIGKTVGRIALNV	AMP	0.707
5	IGKTVGRIALNVL	AMP	0.941
6	GKTVGRIALNVLT	AMP	0.811
7	DTLKNIGKTVGRIALN	AMP	0.509
8	TLKNIGKTVGRIALNV	AMP	0.783
9	LKNIGKTVGRIALNVL	AMP	0.965
10	KNIGKTVGRIALNVLT	AMP	0.721

Cara polar

Anexo 4. Análogos generados para el aumento de la cationicidad

N°	Asignación	Secuencias	HD	C	pI	PM
0	acortado 1	LK N IGK T VGRIAL N V L	-0.04	3	11.17	1709.37
0	acortado 2	IGKTVGRIALNV L	0.04	2	11.01	1353.88
1	K4-C2	IGKKVGRIALNV L	-0.03	3	11.17	1380.95
2	K11-C2	IGKTVGRIAL K V L	0	3	11.17	1367.95
3	K7-C1	LKNIGKKVGRIALNV L	-0.1	4	11.27	1736.44
4	K14-C1	LKNIGKTVGRIAL K V L	-0.07	4	11.27	1723.44
5	K7-C2	IGKTVGKIALNV L	0.09	2	10.02	1325.87
6	W4-C2	IGKWVGKIALNV L	0.13	2	10.02	1410.98
7	T11-C2	IGKTVGKIAL T V L	0.12	2	10.02	1312.87
8	T2-C2	ITKTVGKIALNV L	0.06	2	10.02	1369.92
9	R4-C2	IGKRVGKIALNV L	-0.03	3	11.17	1380.95
10	S4-C2	IGKSVGKIALNV L	0.08	2	10.02	1311.84
11	K5K10-C1	LKNIKKTVGKIALNV L	-0.08	4	10.49	1752.48
12	K5K7-C1	LKNIGKTVKRIALNV L	-0.12	4	11.27	1780.49
13	K7K10-C1	LKNIGKKVGKIALNV L	-0.06	4	10.49	1708.43
14	k4k7-C2	IGKKVGKIALNV L	0.02	3	10.31	1352.94
15	K7K11-C2	IGKTVGKIAL K V L	0.05	3	10.31	1339.94
16	K4K11-C2	IGKKVGRIAL K V L	-0.07	4	11.27	1395.02
17	K4K7K11-C2	IGKKVGKIAL K V L	-0.02	4	10.49	1367.01
18	K7-C1	LKNIGKKVGKIALNV L	-0.06	4	10.49	1708.43
19	K14-C1	LKNIGKTVGKIAL K V L	-0.03	4	10.49	1695.43
20	K7K14-C1	LKNIGKKVGKIAL K V L	-0.09	5	10.61	1722.5
21	S7K10-C1	LKNIGKSVGKIALNV L	-0.01	3	10.31	1667.33
22	K10S14-C1	LKNIGKTVGKIAL S V L	0.02	3	10.31	1654.33
23	S3S7S14-C1	LKSIGKSVGKIAL S V L	0.04	3	10.31	1613.27

Cara no polar

Anexo 5. Análogos generados para la disminución de la hidrofobicidad

N°	Asignación	Secuencias	HD	C	pI	PM
1	acortado 1	LKNIGKTVGRIALNV L	-0.04	3	11.17	1709.37
2	acortado 2	IGKTVGRIALNV L	0.04	2	11.01	1353.88
3	L4-C1	LKNLGKTVGRIALNV L	-0.06	3	11.17	1709.37
4	L5-C1	LKNILKTVGRIALNV L	-0.02	3	11.17	1765.48
5	L8-C1	LKNIGKTLGRIALNV L	-0.05	3	11.17	1723.4

6	L9-C1	LKNIGKTVLRALNVL	-0.02	3	11.17	1765.48
7	L11-C1	LKNIGKTVGRALNVL	-0.06	3	11.17	1709.37
8	L12-C1	LKNIGKTVGRILLNVL	-0.03	3	11.17	1751.46
9	L15-C1	LKNIGKTVGRIALNLL	-0.05	3	11.17	1723.4
10	L1-C2	LLKTVGRIALNVL	0.05	2	11.01	1409.99
11	L2-C2	ILKTLGRIALNVL	0.07	2	11.01	1424.02
12	L5-C2	IGKTLRLALNVL	0.07	2	11.01	1424.02
13	L6-C2	IGKTVLRALNVL	0.05	2	11.01	1409.99
14	L8-C2	IGKTVGRLLNVL	0.04	2	11.01	1395.97
15	L9-C2	IGKTVGRILLNLL	0.06	2	11.01	1410
16	L1L5-C2	LGKTVLRALNLL	0.05	2	11.01	1424.02
17	L6L12-C2	IGKTVLRALNLL	0.07	2	11.01	1424.02

Estrategia 3

Anexo 6. Análogos generados combinando ambas Polar-No polar

N°	Asignación	Secuencias	HD	C	pl	PM
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	-0.02	2	10.01	2344.15
1	K12L13	GFLDTLKNIGKKLGRIALNVLT	-0.07	3	10.3	2385.25
2	L3K22	GLLDTLKNIGKTVGRIALNVLK	-0.07	3	10.3	2337.21
3	R12L13	GFLDTLKNIGKRLGRIALNVLT	-0.09	3	11.01	2413.26
4	R19L20	GFLDTLKNIGKTVGRIALRLLT	-0.07	3	11.01	2400.26
5	L3R22	GLLDTLKNIGKTVGRIALNVLR	-0.1	3	11.01	2365.22
6	K5K8L9	GFLDKLKKLGKTVGRIALNVLT	-0.09	4	10.47	2385.29
7	k8k12L16	GFLDTLKKIGKKVGRALNVLT	-0.09	4	10.47	2385.29
8	K12L13K19	GFLDTLKNIGKKLGRIALKVLT	-0.09	4	10.47	2399.32
9	K19L20K22	GFLDTLKNIGKTVGRIALKLLK	-0.11	4	10.47	2412.32
10	L2K5K22	GLLDKLKNIGKTVGRIALNVLK	-0.09	4	10.47	2351.28
11	R5R8L9	GFLDRLKRLGKTVGRIALNVLT	-0.15	4	11.73	2441.31
12	R8R12L16	GFLDTLKRIGKRVGRALNVLT	-0.15	4	11.73	2441.31
13	R12L13R19	GFLDTLKNIGKRLGRIALRVLT	-0.15	4	11.73	2455.34
14	R19L20R22	GFLDTLKNIGKTVGRIALRLLR	-0.15	4	11.73	2455.34
15	L2R5R22	GLLDRLKNIGKTVGRIALNVLR	-0.17	4	11.73	2420.3
16	K5K8L9K12	GFLDKLKKLGKKVGRALNVLT	-0.14	5	10.59	2412.36
17	K8K12L16K19	GFLDTLKKIGKKVGRALKVLT	-0.12	5	10.59	2399.36
18	K12L13K19K22	GFLDTLKNIGKKLGRIALKVLK	-0.13	5	10.59	2426.39
19	K5K19L20K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALKLLK	-0.13	5	10.59	2426.39
20	L2K5K12K22	GLLDKLKNIGKKVGRALNVLK	-0.15	5	10.59	2391.35
21	R5R8L9R12	GFLDRLKRLGKRVGRIALNVLT	-0.23	5	12.01	2496.39

22	R8R12L16R19	GFLDTLKRIGKRVGRALRVLT	-0.21	5	12.01	2483.39
23	R12L13R19R22	GFLDTLKNIGKRLGRIALRVLR	-0.22	5	12.01	2510.42
24	R5R19L20R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRLLR	-0.22	5	12.01	2510.42
25	L2R5R12R22	GLLDRLKNIGKRVGRIALNVLR	-0.24	5	12.01	2475.38
26	L4K10-C1	LKNLGKTVGKIALNVL	-0.02	3	10.31	1681.36
27	L5K10-C1	LKNILKTVGKIALNVL	0.02	3	10.31	1737.47
28	L8K10-C1	LKNIGKTLGKIALNVL	0	3	10.31	1695.39
29	L9K10-C1	LKNIGKTVLKIALNVL	0.02	3	10.31	1737.47
30	K10L11-C1	LKNIGKTVGKLALNVL	-0.02	3	10.31	1681.36
31	K10L12-C1	LKNIGKTVGKILLNVL	0.01	3	10.31	1723.45
32	L15K10-C1	LKNIGKTVGKIALNLL	0	3	10.31	1695.39
33	L1L2K7-C2	LLKTVGKIALNVL	0.1	2	10.02	1381.98
34	L2L5K7-C2	ILKTLGKIALNVL	0.12	2	10.02	1396.01
35	L5L6K7-C2	IGKTLKIALNVL	0.12	2	10.02	1396.01
36	L6K7L8-C2	IGKTVLKLALNVL	0.1	2	10.02	1381.98
37	K7L8L9-C2	IGKTVGKLLNVL	0.09	2	10.02	1367.96
38	K7L9L12-C2	IGKTVGKILLNLL	0.11	2	10.02	1381.99
39	L1L6K7L12-C2	LGKTVLKIALNLL	0.1	2	10.02	1396.01
40	L6K7L12-C2	IGKTVLKIALNLL	0.12	2	10.02	1396.01
41	L4K10L11-C1	LKNLGKTVGKLALNVL	-0.03	3	10.31	1681.36
42	L5K10-C1	LKNILKTVGKIALNVL	0.02	3	10.31	1737.47
43	L4L8K10-C1	LKNLGKTLGKIALNVL	-0.02	3	10.31	1695.39
44	L9K10-C1	LKNIGKTVLKIALNVL	0.02	3	10.31	1737.47
45	L5K10L11-C1	LKNILKTVGKLALNVL	0.01	3	10.31	1737.47
46	L5K10L12L15-C1	LKNIGKTVGKILLNLL	0.01	3	10.31	1737.48
47	W7K10L15-C1	LKNIGKWVGKIALNLL	0.03	3	10.31	1780.5

Cribado para la selección de mejores análogos

Anexo 7. Cribado por actividad antimicrobiana

N°	Asignación	Secuencias	CAMP3 (AB≥0.980)	AntiBP3 (AB≥0.90)	AMPfun (AB≥0.950)
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	0.922	0.86	0.9588
1	K5K8	GFLDKLKKIGKTVGRIALNVLT	0.984	0.95	0.9506
2	K12K19	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVL	0.981	0.92	0.9889
3	K19K22	GFLDTLKNIGKTVGRIALKVLK	0.983	0.97	0.9822
4	K5K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALNVK	0.989	0.96	0.9433
5	K5K8K12	GFLDKLKKIGKKVGRIALNVLT	0.988	0.95	0.9527
6	K8K12K19	GFLDTLKKIGKKVGRIALKVL	0.988	0.95	0.9856
7	K12K19K22	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLK	0.993	0.97	0.9822

8	K5K19K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALKVLK	0.992	0.98	0.9638
9	R12R19R22	GFLDTLKNIGKRVGRIALRVLR	0.989	0.94	0.9708
10	R5R19R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRVLR	0.99	0.94	0.9688
11	K5K8K12K19	GFLDKLKKIGKKVGRIALKVLT	0.989	0.97	0.9638
12	K8K12K19K22	GFLDTLKKIGKKVGRIALKVLK	0.995	0.98	0.9772
13	K5K12K19K22	GFLDKLKNIGKKVGRIALKVLK	0.981	0.98	0.9032
14	K5K8K19K22	GFLDKLKKIGKTVGRIALKVLK	0.994	0.99	0.9638
15	K5K8K12K22	GFLDKLKKIGKKVGRIALNVLK	0.981	0.98	0.8932
16	R5R8R12R19	GFLDRLKRIGKRVGRIALKVLT	0.986	0.94	0.9423
17	R8R12R19R22	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLR	0.995	0.95	0.9658
18	R5R12R19R22	GFLDRLKNIGKRVGRIALRVLR	0.992	0.94	0.9076
19	R5R8R19R22	GFLDRLKRIGKTVGRIALRVLR	0.995	0.96	0.9688
20	R5R8R12R22	GFLDRLKRIGKRVGRIALNVLR	0.987	0.93	0.8876
21	K5R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALNVLK	0.983	0.94	0.9483
22	K5R8K12	GFLDKLKRIGKKVGRIALNVLT	0.982	0.94	0.9427
23	R5K19R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALKVLR	0.989	0.95	0.9688
24	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	0.984	0.96	0.9498
25	K8R12R19K22	GFLDTLKKIGKRVGRIALRVLK	0.993	0.97	0.9658
26	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	0.984	0.96	0.9498
27	R5K12K19R22	GFLDRLKNIGKKVGRIALKVLR	0.981	0.95	0.9049
28	R4K8K12K19	GFLRTLKKIGKKVGRIALKVLT	0.985	0.97	0.9644
29	R4R8R12R19	GFLRTLKRIGKRVGRIALRVLT	0.994	0.95	0.9362
30	R4K8R12R22	GFLRTLKKIGKRVGRIALNVLR	0.994	0.96	0.9483
31	R4K8K12R19R22	GFLRTLKKIGKKVGRIALRVLR	0.995	0.98	0.9683
32	K5K8L9	GFLDKLKKLGKTVGRIALNVLT	0.982	0.92	0.9506
33	K12L13K19	GFLDTLKNIGKKLGRIALKVLT	0.984	0.97	0.9839
34	K19L20K22	GFLDTLKNIGKTVGRIALKLLK	0.985	0.96	0.9822
35	L2K5K22	GLLDKLKNIGKTVGRIALNVLK	0.986	0.95	0.9297
36	K5K8L9K12	GFLDKLKKLGKKVGRIALNVLT	0.987	0.95	0.9527
37	K8K12L16K19	GFLDTLKKIGKKVGRALKVLT	0.987	0.93	0.9821
38	K12L13K19K22	GFLDTLKNIGKKLGRIALKVLK	0.994	0.97	0.9822
39	K5K19L20K22	GFLDKLKNIGKTVGRIALKLLK	0.994	0.98	0.9644
40	A2R12L13R19R22	GFLDTLKNIGKRLGRIALRVLR	0.991	0.94	0.9783
41	R5R19L20R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRLLR	0.991	0.94	0.9694
42	K7-C2	IGKTVGKIALNVL	0.982	0.73	0.9894
43	T11-C2	IGKTVGKIALTVL	0.981	0.7	0.9967
44	S4-C2	IGKSVGKIALNVL	0.985	0.77	0.9969
45	K5K10-C1	LKNIKKTVGKIALNVL	0.98	0.74	0.9988
46	K7K11-C2	IGKTVGKIALKVL	0.98	0.81	0.9967
47	S7K10-C1	LKNIGKSVGKIALNVL	0.983	0.6	0.9989

48	K10S14-C1	LKNIGKTVGKIALSVL	0.98	0.54	0.9864
49	S3S7S14-C1	LKSIGKSVGKIALSVL	0.98	0.53	0.9861
50	L4K10-C1	LKNLGKTVGKIALNVL	0.982	0.65	1
51	L5K10-C1	LKNILKTVGKIALNVL	0.987	0.63	1
52	L8K10-C1	LKNIGKTLGKIALNVL	0.984	0.63	0.99
53	L9K10-C1	LKNIGKTVLKIALNVL	0.987	0.61	1
54	K10L11-C1	LKNIGKTVGKLALNVL	0.982	0.64	1
55	K10L12-C1	LKNIGKTVGKILLNVL	0.986	0.72	1
56	L15K10-C1	LKNIGKTVGKIALNLL	0.984	0.67	1
57	L1L2K7-C2	LLKTVGKIALNVL	0.98	0.81	0.9914
58	L2L5K7-C2	ILKTLGKIALNVL	0.987	0.86	0.9814
59	L5L6K7-C2	IGKTLKIALNVL	0.99	0.75	0.9914
60	L6K7L8-C2	IGKTVLKIALNVL	0.987	0.81	0.9947
61	K7L8L9-C2	IGKTVGKLLNVL	0.985	0.85	0.9822
62	K7L9L12-C2	IGKTVGKILLNLL	0.989	0.84	0.9847
63	L1L6K7L12-C2	LGKTVLKIALNLL	0.983	0.7	0.9861
64	L6K7L12-C2	KGKTVLKIALNLL	0.99	0.79	0.9861
65	L4K10L11-C1	LKNLGKTVGKLALNVL	0.981	0.68	1
66	L5k10-C1	LKNILKTVGKIALNVL	0.987	0.63	1
67	L4L8K10-C1	LKNLGKTLGKIALNVL	0.984	0.69	0.99
68	L9K10-C1	LKNKGKTVLKIALNVL	0.987	0.61	1
69	G4L5K10L11-C1	LKNGLKTVGKLALNVL	0.981	0.92	0.9894
70	K5K10L12L15-C1	LKNKGKTVGKILLNLL	0.981	0.92	0.9854

Anexo 8. Cribado por efecto hemolítico

Nº	Asignación	Secuencias	HAPPENN (HM ≤0.45)	DBAASP (A/NA)	DBAASP VP
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVL	0.477	Active	0.64
1	K12K19	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLT	0.127	Not Active	0.51
2	K8K12K19	GFLDTLKKIGKKVGRIALKVLT	0.361	Not Active	0.54
3	K12K19K22	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLK	0.445	Not Active	0.7
4	R12R19R22	GFLDTLKNIGKRVGRIALRVLR	0.26	Not Active	0.85
5	R5R19R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRVLR	0.403	Not Active	0.85
6	K5K8K12K19	GFLDKLKKIGKKVGRIALKVLT	0.302	Not Active	0.53
7	R5R8R12R19	GFLDRLKRIGKRVGRIALKVLT	0.107	Not Active	0.8
8	R8R12R19R22	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLR	0.229	Not Active	0.85
9	R5R12R19R22	GFLDRLKNIGKRVGRIALRVLR	0.328	Not Active	0.84
10	R5R8R19R22	GFLDRLKRIGKTVGRIALRVLR	0.251	Not Active	0.85
11	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	0.072	Not Active	0.67
12	K5R8K12R19	GFLDKLKRIGKKVGRIALRVLT	0.072	Not Active	0.67

13	R4K8K12K19	GFLRTLKKIGKKVGRIALKVLT	0.148	Not Active	0.59
14	R4R8R12R19	GFLRTLKRIGKRVGRIALRVLT	0.039	Not Active	0.78
15	R4K8K12R19R22	GFLRTLKKIGKKVGRIALRVLR	0.273	Not Active	0.7
16	K8K12L16K19	GFLDTLKKIGKKVGRALALKVLT	0.188	Not Active	0.52
17	A2R12L13R19R22	GALDTLKNIGKRLGRIALRVLR	0.36	Not Active	0.81
18	R5R19L20R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRLLR	0.297	Not Active	0.8
19	K7-C2	IGKTVGKIALNVL	0.373	Not Active	0.68
20	K5K10-C1	LKNIKKTVGKIALNVL	0.25	Not Active	0.54
21	K7K11-C2	IGKTVGKIALKVL	0.144	Not Active	0.65
22	S3S7S14-C1	LKSIGKSVGKIALSVL	0.268	Not Active	0.52
23	L4K10-C1	LKNLGKTVGKIALNVL	0.35	Not Active	0.51
24	K10L11-C1	LKNIGKTVGKLALNVL	0.292	Not Active	0.5
25	L4K10L11-C1	LKNLGKTVGKLALNVL	0.391	Not Active	0.54
26	L9K10-C1	LKNKGKTVLKIALNVL	0.194	Not Active	0.56
27	G4L5K10L11-C1	LKNGLKTVGKLALNVL	0.185	Not Active	0.54
28	K5K10L12L15-C1	LKNKGKTVGKILLNLL	0.098	Not Active	0.54

Anexo 9. Cribado por estructura alfa hélice α

N°	Asignación	Secuencias	PRABI ($\alpha H \geq 0.70\%$)
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVL	68.18%
1	K12K19K22	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLK	72.73%
2	R12R19R22	GFLDTLKNIGKRVGRIALRVLR	72.73%
3	R8R12R19R22	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLR	72.73%
4	R5R12R19R22	GFLDRLKNIGKRVGRIALRVLR	72.73%
5	R5R8R19R22	GFLDRLKRIGKTVGRIALRVLR	72.73%
6	A2R12L13R19R22	GALDTLKNIGKRLGRIALRVLR	72.73%
7	R5R19L20R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRLLR	77.27%
8	L4K10L11-C1	LKNLGKTVGKLALNVL	81.25%
9	G4L5K10L11-C1	LKNGLKTVGKLALNVL	81.25%

Anexo 10. Cribado de estabilidad en solución acuosa

N°	Asignación	Secuencias	ProtParam	
			E/NE	IE
0	<i>Pictuseptina 1</i>	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT	Estable	11.11
1	K12K19K22	GFLDTLKNIGKKVGRIALKVLK	Estable	-4.33
2	R8R12R19R22	GFLDTLKRIGKRVGRIALRVLR	Estable	38.28
3	R5R8R19R22	GFLDRLKRIGKTVGRIALRVLR	Estable	26.87
4	R5R19L20R22	GFLDRLKNIGKTVGRIALRLLR	Estable	32.02
5	L4K10L11-C1	LKNLGKTVGKLALNVL	Estable	-17.16
6	G4L5K10L11-C1	LKNGLKTVGKLALNVL	Estable	-26.55