



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTRATEGIAS DE DISEÑO RACIONAL DE PÉPTIDOS
ANTIMICROBIANOS INSPIRADOS EN CRUZIOSEPTINA-1**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: GABRIELA FERNANDA SOSA POZO

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Gabriela Fernanda Sosa Pozo, con documento de identidad N° 1718436395, 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 la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 16 de febrero de 2024



Gabriela Fernanda Sosa Pozo

CI: 1718436395

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Gabriela Fernanda Sosa Pozo, con documento de identidad N° 1718436395, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Estrategias de diseño racional de péptidos antimicrobianos inspirados en cruzioseptina-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.

Tena, 16 de febrero de 2024



Gabriela Fernanda Sosa Pozo

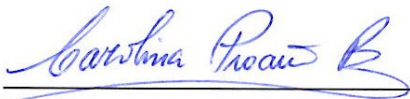
CI: 1718436395

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: "Estrategias de diseño racional de péptidos antimicrobianos inspirados en cruzioseptina-1", en la modalidad: tesis, fue realizado por: Gabriela Fernanda Sosa Pozo, bajo mi dirección.

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

Tena, 16 de febrero de 2024



Carolina del Carmen Proaño Bolaños
CI:1714818760

Agradecimiento

Enormemente agradecida con el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam por permitirme realizar mi trabajo de titulación.

En especial a mi directora de tesis, PhD. Carolina Proaño, por guiarme y aventurarse conmigo en esta investigación. Fue un modelo a seguir como científica. Gracias por su incondicional apoyo e incentivarme a seguir creciendo.

A las técnicas de investigación de laboratorio por orientar mis experimentos y asistencia en el manejo de equipos durante este trabajo. Me llevo enseñanzas valiosas.

Dedicatoria

A mi padre y madre por brindarme su apoyo estos años para cumplir un sueño. Me han enseñado valores imprescindibles para el desarrollo de mi persona y para la vida.

A mis hermanas, Carolina y Victoria, por ser el motor de mi motivación e inspiración.

A mi tío Dionisio y mi abuela Teófila, siempre me incentivaron a ser una gran profesional y no olvidar mis raíces. Un abrazo al cielo.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR.....	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR...	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii

1	CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN...	1
1.1	Antecedentes	1
1.1.1	Péptidos antimicrobianos	1
1.1.2	PAMs en secreciones de anuros	1
1.1.3	Cruzioseptinas	2
1.1.4	Fronteras de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos.....	2
1.1.5	Diseño de análogos.....	3
1.1.6	Herramientas bioinformáticas	5
1.2	Planteamiento del problema a investigar	6
1.3	Justificación de la investigación.....	7
1.4	Objetivos de la investigación	8
2	CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	9
2.1	Estrategias de diseño	9
2.1.1	Estrategia 1: Modificación de propiedades fisicoquímicas	9
2.1.2	Estrategia 2: Sustitución por aminoácidos predominantes en PAMS.....	10
2.1.3	Selección de análogos prometedores.....	10
2.1.4	Acoplamiento molecular	11
2.1.5	Síntesis de análogos	11
2.1.6	Ensayos exploratorios de sensibilidad microbiana.....	11
3	CAPITULO III: Resultados.....	13
3.1	Biblioteca de análogos	13
3.1.1	Estrategia 1: Análogos con modificaciones fisicoquímicas	14
3.1.2	Estrategia 2: Análogos con aminoácidos comunes en PAMs	14
3.1.3	Análogos prometedores	14

3.2	Modelamiento estructural	17
3.3	Acoplamiento molecular	21
3.4	Sensibilidad microbiana.....	22
4	CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	24
4.1	Estrategias de diseño	24
4.2	Caracterización de análogos prometedores	25
4.3	Acoplamiento molecular	26
4.4	Actividad antimicrobiana de análogos prometedores.....	27
5	CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
	Referencias	
	Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2. Escalas de hidrofobicidad.....	9
Tabla 1-3. Secuencias de análogos prometedores.....	16
Tabla 2-3. Propiedades fisicoquímicas de los análogos prometedores.....	16
Tabla 3-3. Predicción de actividad de los análogos.....	17
Tabla 4-3. Valores de afinidad entre membranas y análogos.	22
Tabla 5-3. Ensayo de sensibilidad microbiana en agar.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Diagrama helicoidal de cruzioseptina-1.....	3
Figura 2-1.	Aminoácidos predominantes en sitios específicos de la secuencia de PAMs.....	5
Figura 1-3.	Esquema de método de selección de análogos prometedores mediante cribados.	13
Figura 2-3.	Distribución de predicción de análogos de cada estrategia.	15
Figura 3-3.	Predicción de estructura de análogos prometedores.....	19
Figura 4-3.	Diagrama de rueda helicoidal de a) cruzioseptina-1, b) análogo 21A4K15K18K y c) análogo 2L15K.....	20
Figura 5-3.	Modelos 3D de cruzioseptina-1 (a), análogo 21A4K15K18K (b), análogo 2L15K (c) y gráfico de Ramachandran.	21
Figura 6-3.	Acoplamiento molecular de CZS-1 (gris), 21A4K15K18K (naranja), 2L15K (amarillo) con membrana bacteriana (a) y membrana humana (b).	22

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Diagrama de flujo de selección de análogos prometedores
- Anexo 2. Análogos generados aumentando la cationicidad.
- Anexo 3. Cribado por efecto hemolítico de análogos catiónicos.
- Anexo 4. Cribado por estructura de análogos catiónicos.
- Anexo 5. Análogos generados modificando la hidrofobicidad.
- Anexo 6. Cribado por actividad antibacteriana y antifúngica.
- Anexo 7. Cribado por efecto hemolítico de análogos hidrofóbicos.
- Anexo 8. Análogos generados sustituyendo aminoácidos por otros comunes en PAMs.
- Anexo 9. Cribado por actividad antibacteriana.
- Anexo 10. Cribado por efecto hemolítico.
- Anexo 11. Cribado por estructura.
- Anexo 12. Análogos generados sustituyendo aminoácidos por otros comunes en PAMs.
- Anexo 13. Cribado por actividad antibacteriana.
- Anexo 14. Cribado por efecto hemolítico.
- Anexo 15. Cribado por estructura.
- Anexo 16. Análogos generados de combinaciones estrategia 1
- Anexo 17. Cribado por efecto hemolítico.
- Anexo 18. Cribado por actividad antiparasitaria
- Anexo 19. Análogos generados de combinaciones estrategia 2
- Anexo 20. Cribado por actividad antimicrobiana.
- Anexo 21. Cribado por actividad antiparasitaria.

Resumen

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos inspirados en péptidos antimicrobianos ha suscitado un gran interés por su amplio espectro de actividad. Sin embargo, enfrentan desafíos como baja actividad y alta toxicidad. La investigación se centró en diseñar análogos inspirados en el péptido cruzioseptina-1, con mayor actividad y menor efecto hemolítico. Librerías de análogos se crearon mediante dos estrategias: 1) Sustitución por aminoácidos comunes en péptidos antimicrobianos y 2) ajuste de cationicidad e hidrofobicidad. Se analizó su potencial antimicrobiano, citotoxicidad, estructura y propiedades fisicoquímicas mediante herramientas bioinformáticas. Se sintetizó un análogo representativo de cada estrategia: 2L15K y 21A4K15K18K. Se corroboró su masa molecular por espectrometría de masas MALDI TOF. Para evaluar el potencial antimicrobiano se realizaron ensayos de actividad antibiótica. El potencial citotóxico se evaluó realizando acoplamiento molecular entre péptido-membrana, se utilizaron modelos de membrana bacteriana y humana. Los análisis bioinformáticos sugieren que los análogos superan la actividad de cruzioseptina-1. La mayoría de los análogos generados por ambas estrategias tienden a ser hemolíticos. La interpretación de los resultados de acoplamiento molecular sugiere que los análogos poseen mayor afinidad por la inserción en la membrana bacteriana que en la humana. Ambos análogos sintetizados mostraron actividad contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* resistente a ampicilina. Finalmente, las estrategias de diseño racional generan análogos con mayor probabilidad de actividad antimicrobiana. Adicionalmente, las herramientas bioinformáticas filtran análogos con baja actividad antimicrobiana, elevado efecto hemolítico y pérdida de estructura. Este enfoque generó análogos más bioactivos en pruebas *in vitro*, a través de estrategias de diseño racional y análisis bioinformáticos.

PALABRAS CLAVE: Péptidos antimicrobianos, cruzioseptina-1, diseño racional, herramientas bioinformáticas, análogo

Abstract

The development of new therapeutic agents inspired by antimicrobial peptides has aroused great interest due to their broad spectrum of activity. However, they face challenges such as low activity and high toxicity. This research focused on designing analogs inspired by the peptide cruzioseptin-1, with increased activity and reduced hemolytic effect. Analog libraries were created using two strategies: 1) Substitution with common amino acids in antimicrobial peptides and 2) adjustment of cationicity and hydrophobicity. Their antimicrobial potential, cytotoxicity, structure, and physicochemical properties were analyzed using bioinformatics tools. A representative analog of each strategy was synthesized: 2L15K and 21A4K15K18K. Their molecular mass was confirmed by MALDI TOF mass spectrometry. Screening of microbial sensitivity were performed to evaluate the antimicrobial potential. The cytotoxic potential was assessed by performing molecular docking between peptide and membrane, using bacterial and human membrane models. Bioinformatics analyses suggest that analogs surpass the activity of cruzioseptin-1. Most of the analogs generated by both strategies tend to be hemolytic. The interpretation of the molecular docking results suggests that the analogs have a higher affinity for insertion into the bacterial membrane than into the human membrane. Both synthesized analogs showed activity against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and ampicillin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Finally, rational design strategies generate analogs with a higher probability of antimicrobial activity. Additionally, bioinformatics tools filter out analogs with low antimicrobial activity, high hemolytic effect, and loss of structure. This approach generated more bioactive analogs in *in vitro* tests, through rational design strategies and bioinformatics analysis.

KEYWORDS: Antimicrobial peptides, cruzioseptin-1, rational design, bioinformatic tools, analog

1 **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

1.1 **Antecedentes**

1.1.1 ***Péptidos antimicrobianos***

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son secuencias de menos de 50 aminoácidos que inhiben el crecimiento de patógenos como virus, bacterias, hongos, parásitos y protozoos [1]. Son moléculas capaces de alterar la membrana celular, modular la respuesta inmune y regular la inflamación [2,3]. A diferencia de los antibióticos convencionales que actúan sobre dianas específicas de las células blanco, los péptidos principalmente lisan las membranas de los microorganismos, lo cual explica el amplio espectro de PAMs y su baja capacidad de generar resistencia microbiana [4].

Las propiedades fisicoquímicas que caracterizan a los PAMs son: cationicidad, hidrofobicidad y anfipaticidad. En su mayoría tienen carga positiva, comprendida entre +2 hasta +9. La hidrofobicidad de cada péptido está definida por los residuos que lo componen y es esencial para determinar el grado de inserción con el sector hidrofóbico de la membrana [5,6]. Además, los PAMs son anfipáticos, es decir, poseen una cara hidrofóbica interna y otra cara hidrofílica externa. A mayor tamaño en la cara hidrofílica se reduce la actividad del péptido [7,8]. Por otra parte, las estructuras más frecuentes y estables en PAMs son la α -hélice y el giro β [9,10].

1.1.2 ***PAMs en secreciones de anuros***

Una de las fuentes naturales más ricas de péptidos antimicrobianos son las secreciones de anuros. En este contexto, los PAMs representan un componente del sistema inmune innato que defiende al animal de microorganismos patógenos [11]. Se ha reportado que el 99.9% de los PAMs provenientes de anuros poseen 24 aminoácidos de longitud en promedio, carga de +2.5 [12] y al menos el 50% de sus aminoácidos son hidrofóbicos [11]. En ambientes acuosos no conservan una estructura secundaria estable; sin embargo, son propensos a formar una estructura anfipática alfa hélice en ambientes de vesículas de fosfolípidos o en solventes como trifluoroetanol/agua (50% v/v) [11]. Los péptidos antimicrobianos de anuros se pueden clasificar en familias según su secuencia

de aminoácidos. Las familias más importantes son las phylloseptinas, dermaseptinas, picturinas, phylloxinas, plasticinas y cruzioseptinas [13].

1.1.3 Cruzioseptinas

En 2016, se publicó el descubrimiento de una nueva familia de péptidos catiónicos, las cruzioseptinas, presentes en la secreción cutánea de la rana *Cruziohyla calcarifer*. Hasta el momento, cruzioseptina-1 (CZS-1) es el péptido más potente de esta familia, posee 21 aminoácidos y se caracteriza por compartir, con otras cruzioseptinas, la secuencia GFLD- en el extremo N-terminal y el motivo de secuencia –VALGAVSK– en medio del péptido. Ha mostrado actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* [14], sin embargo, la concentración mínima inhibitoria más alta 32 mg/mL induce el 20% de hemólisis. El principal mecanismo de acción es la disrupción de la membrana debido a las interacciones electrostáticas [15].

Bermúdez e investigadores [16] han diseñado análogos a partir de la secuencia de cruzioseptina-1. Las estrategias utilizadas fueron: el aumento de cationicidad e hidrofobicidad y truncado de la secuencia. Para el aumento de carga se sustituyó aminoácidos de la secuencia por lisinas en el lugar 4 y 15, formando el análogo [K4K15]CZS-1. Esta estrategia tuvo los mejores resultados *in vitro* comparada con el truncado de la secuencia. La concentración mínima inhibitoria contra *E. coli* se redujo de 32 a 8 mg/mL y contra *S. aureus* de 8 a 4 mg/mL en comparación con cruzioseptina-1. Aunque el análogo no incrementó la actividad contra *C. albicans* [13]. En cambio, los análogos con acortamiento de secuencia no mostraron incremento en la actividad antimicrobiana.

Cabe resaltar, el efecto hemolítico del análogo K4K15 fue menor con respecto a la cruzioseptina-1. Desde esta perspectiva, es posible generar análogos con mayor actividad y menor efecto hemolítico utilizando como plantilla la cruzioseptina-1. No obstante, quedan modificaciones estratégicas por explorar para optimizar la actividad del péptido.

1.1.4 Fronteras de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos

Los PAMs tienen un amplio espectro de actividad contra microorganismos, pero también pueden ser citotóxicos para células eucariotas, particularmente eritrocitos [17]. A pesar

de sus características deseables como agentes terapéuticos, muchos péptidos son descartados en la fase clínica y preclínica. Las principales limitaciones son: la toxicidad, baja actividad, baja estabilidad en condiciones fisiológicas, rápida degradación y altos costos de producción [18]. Por ello, las estrategias de diseño de PAMs se han centrado en el desarrollo de nuevos péptidos con propiedades estructurales y fisicoquímicas que permitan maximizar la actividad antimicrobiana mientras reducen la citotoxicidad en ambientes fisiológicos.

1.1.5 Diseño de análogos

El diseño racional de PAMs es un enfoque científico para desarrollar nuevos péptidos y mejora sus propiedades fisicoquímicas, actividad, citotoxicidad y estabilidad. Este proceso implica el desarrollo de métodos para la predecir propiedades de los PAMs, lo que permite identificar péptidos con potencial antes de su síntesis [19]. Las estrategias más utilizadas en el diseño de análogos son el aumento de cationicidad en la cara polar y la modulación de la hidrofobicidad en la cara hidrofóbica (Figura 1-1) [20–22].

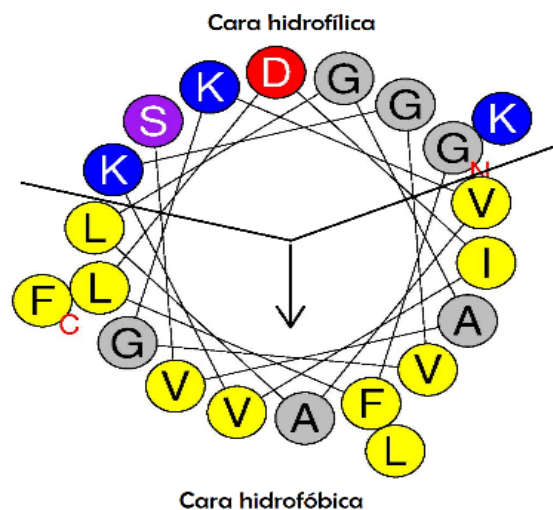


Figura 1-1. Diagrama helicoidal de cruzioseptina-1.

La figura emplea código de una letra para los aminoácidos. Los residuos cargados positivamente como lisina (K) en azul delimitan el sector hidrofílico y los residuos en amarillo delimitan el sector hidrofóbico. Las letras rojas indican el extremo N- terminal y C-terminal. Gráfico generado con Heliquist y posteriormente modificado.

Realizado por: Sosa, 2023.

Las sustituciones por aminoácidos catiónicos aumentan la carga del péptido y la afinidad por membranas. Los PAMs catiónicos son atraídos electrostáticamente por las cabezas lipídicas de la membrana del patógeno, cargada negativamente. El aumento de carga incrementa la actividad antimicrobiana, no obstante, una carga mayor a nueve aumenta la afinidad por la membrana del huésped y se pierde la especificidad por el patógeno [19]. Además, el aumento desmesurado de la carga tiende a deformar la estructura helicoidal del péptido [23], disminuyendo su actividad.

La sustitución de aminoácidos por lisina, aminoácido polar cargado positivamente, tiende a aumentar significativamente la actividad antimicrobiana [16]. Se ha estudiado el efecto de modulación de carga con sustituciones de lisina en el péptido V13K en la cara polar, donde al aumentar la carga desde +4 a +8 mejoró la actividad mientras se mantuvo bajo el efecto hemolítico [6]. Sin embargo, cuando se aumentó la carga a +9 y +10 incrementó dramáticamente la hemólisis. Al contrario, cuando se redujo la carga neta a menos de +4 el péptido perdió totalmente la actividad.

En el mismo sentido, la sustitución de aminoácidos por residuos más hidrofóbicos aumenta la afinidad por la membrana microbiana, sin embargo, es necesario establecer un umbral para la modulación de la hidrofobicidad [6,22]. El aumento de la hidrofobicidad se relaciona directamente con hemólisis, mientras que su disminución reduce la actividad antimicrobiana. También, la longitud de cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos impacta en la profundidad de inserción del péptido en la membrana, es el llamado “efecto snorkel” [22].

Por otro lado, el análisis de secuencias naturales de PAMs permiten identificar patrones o características de residuos conservados importantes para la actividad y pueden incorporarse al diseño de nuevos análogos [24]. El análisis de secuencias de PAMs (Figura 2-1) se ha usado para guiar modificaciones racionales en secuencias naturales con la variación de parámetros independientes para observar su papel en el cambio de actividad y selectividad [24]. Además, es usado como modelo simplificado con características estructurales y fisicoquímicas definidas para explicar el comportamiento de PAMs naturales. En esta investigación se utilizó el análisis de aminoácidos comunes en PAMs para modificar cruzioseptina-1 tanto en la cara hidrofílica como en la cara hidrofóbica, no hubo modificaciones por aminoácidos no proteinogénicos.

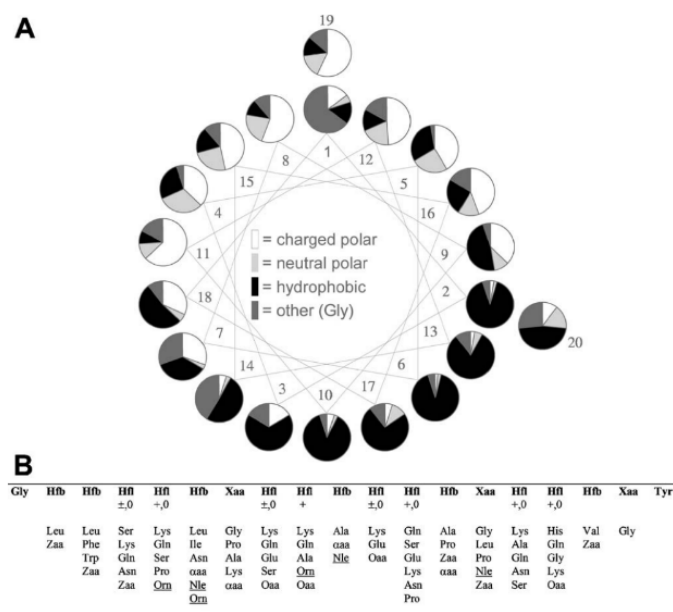


Figura 2-1. Aminoácidos predominantes en sitios específicos de la secuencia de PAMs. A) Rueda helicoidal de frecuencia de tipos de aminoácidos. **B)** Aminoácidos comunes de acorde a la posición.

Fuente: Zelezensky & Tossi, 2006, pág 1438.

1.1.6 Herramientas bioinformáticas

La predicción del comportamiento de péptidos requiere de la sinergia de técnicas y experimentos computacionales para mayor precisión en condiciones fisiológicas. La determinación de las propiedades fisicoquímicas y estructura es importante para explicar el comportamiento del péptido. HeliQuest (<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) y PepCalc (<https://pepcalc.com/>) son herramientas que calculan las propiedades fisicoquímicas como carga a pH fisiológico, peso molecular, hidrofobicidad, solubilidad y composición de aminoácidos [25].

La predicción de la estructura permite predecir el mecanismo de acción y estabilidad de la molécula. El servidor CFSSP (<https://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) predice la estructura secundaria basado en la frecuencia relativa de cada aminoácido para formar alfa hélices, hojas beta o giros con una precisión del 80%. Adicionalmente, el servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) es un recurso de predicción automatizada de la estructura tridimensional de proteínas basadas en alineamientos de análogos del Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), un repositorio de estructuras 3D de macromoléculas biológicas obtenidas experimentalmente [26,27].

Por otra parte, existen herramientas bioinformáticas para predecir la actividad antimicrobiana, efecto hemolítico y citotoxicidad de péptidos. El servidor iAMPred (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>) predice la probabilidad de que un péptido sea antibacterial, antifúngico y antiviral analizando sus propiedades fisicoquímicas, composicionales y estructurales [28]. La estimación de actividad antiparasitaria de péptidos es posible por PredAPP (<http://predapp.xialab.info>) con 88% de precisión. En otro sentido, HemoPi predice la actividad hemolítica basado en bibliotecas de péptidos hemolíticos evaluados *in vitro*, analiza los residuos o motivos predominantes de péptidos hemolíticos [29].

Una herramienta clave en el diseño racional de péptidos es el acoplamiento molecular porque simula la interacción intermolecular que predice el modo de unión y afinidad entre el receptor y ligando [26]. Autodock es un software libre para uso académico que predice la afinidad de unión y el modo de interacción de las moléculas. Se utilizaron membranas de la base de datos RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) que han sido empleadas por Cuesta, et al [31,32] para evaluar el potencial antimicrobiano de dermaseptinas en microorganismos modelo.

1.2 Planteamiento del problema a investigar

La resistencia antimicrobiana es un problema grave de salud pública que se estima que causa más de 700.000 muertes anuales en el mundo [33]. 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 [34]. La resistencia antimicrobiana se debe al uso no responsable de antibióticos tanto en personas como animales, además de la contaminación de fuentes hídricas con medicamentos o sus residuos [35–38].

El desarrollo de nuevos fármacos seguros puede tomar entre 10 a 15 años, desde el descubrimiento de la molécula hasta su comercialización, lo cual interfiere en la generación de soluciones rápidas contra la resistencia antimicrobiana. Alrededor de 3000 PAMs han sido descubiertos, de los cuales solo 7 han sido aprobados por la FDA para su comercialización como medicamentos tópicos y algunos se han inyectado para tratar infecciones bacterianas graves [39]. La mayoría son descartados tras pasar la fase clínica y preclínica debido a inestabilidad en condiciones fisiológicas, toxicidad,

requerimiento de concentraciones muy altas, elevados costos de producción, susceptibilidad a modificaciones por enzimas, baja potencia, etc [40]. Para que un péptido sea considerado como una opción terapéutica deben ser mejores que los antibióticos existentes. En este sentido, es indispensable que tenga poderosas propiedades antimicrobianas, bajo o nulo efecto hemolítico y citotóxico [41,42]. El descarte de PAMs como agentes terapéuticos se debe a la falta de optimización de sus propiedades antes de los ensayos clínicos [3].

1.3 Justificación de la investigación

La necesidad de nuevos agentes terapéuticos crece por el incremento de enfermedades infecciosas debido a la aparición de cepas resistentes y el número ínfimo de nuevos fármacos antimicrobianos descubiertos en las últimas décadas [43]. Los péptidos se presentan como una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales por su acción rápida y baja toxicidad [19]. Sin embargo, para ser comercializados deben superar varias pruebas clínicas que demuestren su estabilidad, toxicidad y capacidad antimicrobiana. Es por ello que, el diseño de análogos y su análisis *in silico*, permite ahorrar recursos y descartar aquellos que puedan presentar inconvenientes en pruebas futuras.

Los PAMs naturales presentan limitaciones en los ensayos clínicos, como baja actividad o potente efecto hemolítico, y suelen ser descartados. Por ello, es importante realizar modificaciones estratégicas para optimizar sus propiedades. De esta manera, se obtienen análogos inspirados en secuencias naturales con mayor potencial antimicrobiano, mejor selectividad hacia los patógenos y estabilidad en condiciones fisiológicas [40]. El diseño *in silico* permite analizar la relación entre la modificación de la secuencia y el cambio en sus propiedades. En este sentido, se pueden descartar análogos con propiedades no deseables y optimizar las modificaciones que conducen al aumento de actividad en secuencias naturales.

Previo a este trabajo se han diseñado 3 análogos inspirados en cruzioseptina-1, cada uno usando un tipo de modificación como aumento de cationicidad, truncando y la combinación de ambas. De los análogos diseñados solo uno tuvo mejor actividad *in vitro* contra *E. coli* y *S. aureus*, sin embargo, disminuyó su actividad contra *C. albicans* y tuvo menor efecto hemolítico en comparación con la plantilla [16]. Por eso, en el presente

trabajo se emplearán estrategias de diseño capaces de generar al menos 50 análogos y evaluar su relación entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicrobiana.

1.4 Objetivos de la investigación

Objetivo general

Diseñar bibliotecas de análogos inspirados en cruzioseptina-1 con mayor potencial antimicrobiano y menor efecto hemolítico modificando las propiedades fisicoquímicas y sustituyendo aminoácidos predominantes en PAMs.

Objetivos específicos

- Diseñar análogos de cruzioseptina-1 modificando las propiedades fisicoquímicas y estructurales.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas y estructurales con herramientas *in silico*.
- Evaluar el potencial antimicrobiano y el efecto citotóxico de los análogos más prometedores.

2 CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Estrategias de diseño

Se utilizó como referente el péptido cruzioseptina-1 para diseñar análogos. Se introdujo la secuencia GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF en HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) para generar el diagrama helicoidal y definir la cara hidrofílica e hidrofóbica. En este mismo servidor, se obtuvieron las propiedades fisicoquímicas del péptido modelo como: carga, peso molecular e hidrofobicidad. La tendencia helicoidal se determinó con PRABI (https://npsaprabl.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html).

2.1.1 Estrategia 1: Modificación de propiedades fisicoquímicas

Se aumentó la cationicidad en la región hidrofílica de CZS-1. Cada aminoácido de esta cara se reemplazó por lisina (K) de manera individual. Adicionalmente, se llevaron a cabo sustituciones con lisina en más de una posición a la vez. Respecto a la cara hidrofóbica se sustituyeron uno por uno los aminoácidos por otros menos hidrofóbico, de acorde a cada posición (Tabla 1-2).

Tabla 1-2. Escalas de hidrofobicidad.

Aminoácido			Escala de hidrofobicidad			
Nombre	Código 3 letras	Código 1 letra	Kyte y Doolittle, 1982	Eisenberg et al., 1982a	Fauchere y Pliska, 1983	Tossi et al., 2002
Alanina	Ala	A	1,8	0,25	0,31	-1,1
Arginina	Arg	R	-4,5	-1,76	-1,01	-10
Asparagina	Asn	N	-3,5	-0,64	-0,6	-7,1
Aspartato	Asp	D	-3,5	-0,72	-0,77	-8,3
Cisteína	Cys	C	2,5	0,04	1,54	-2,3
Glutamina	Gln	Q	-3,5	-0,69	-0,22	-6
Glutamato	Glu	E	-3,5	-0,62	-0,64	-8,3
Glicina	Gly	G	-0,4	0,16	0	-2,4
Histidina	His	H	-3,2	-0,4	0,13	-3,8
Isoleucina	Ile	I	4,5	0,73	1,8	8,7
Leucina	Leu	L	3,8	0,53	1,7	9,7
Lisina	Lys	K	-3,9	-1,1	-0,99	-9,9
Metionina	Met	M	1,9	0,26	1,23	4,6
Fenilalanina	Phe	F	2,8	0,61	1,79	10
Prolina	Pro	P	-1,6	-0,07	0,72	-0,2
Serina	Ser	S	-0,8	-0,26	-0,04	-4,3
Treonina	Thr	T	-0,7	-0,18	0,26	-3,8
Triptófano	Trp	W	-0,9	0,37	2,25	9,7
Tirosina	Tyr	Y	-1,3	0,02	0,96	2,5
Valina	Val	V	4,2	0,54	1,22	4,1

Nota: Los aminoácidos con valores positivos son más hidrofóbicos, en cambio, aquellos con valores negativos tienden a ser hidrofílicos. El valor 0 indica que el aminoácido posee una polaridad neutra (ni hidrofílico ni hidrofóbico) y lo que le permite adaptarse a diferentes entornos.

Fuente: Sánchez, Camargo y Orduz, 2016, pág.61

2.1.2 Estrategia 2: Sustitución por aminoácidos predominantes en PAMS

La investigación de Zelezetsky & Tossi [24] detalla la predominancia de aminoácidos específicos en cada posición de la secuencia en PAMs (Figura 2-1). De acuerdo a la investigación anterior, se sustituyó cada aminoácido de la secuencia de CZS-1 por aminoácidos frecuentes en otros PAMs tanto en la cara hidrofílica como en la cara hidrofóbica.

2.1.3 Selección de análogos prometedores

Mediante sustituciones se generó una biblioteca de análogos de cada estrategia. Cada biblioteca se dividió en modificaciones en la cara polar y no polar. La actividad antimicrobiana, efecto hemolítico y toxicidad se evaluó *in silico* con herramientas bioinformáticas (Anexo 1). En la primera fase, se utilizó iAMPred para predecir la actividad antimicrobiana, HemoPi para estimar el efecto hemolítico y con CFSSP se dilucidó la estructura secundaria de los análogos. Las predicciones se compararon con los resultados de CZS-1. Se descartaron aquellos análogos con menor o igual probabilidad de ser antimicrobianos (Figura 1-3). De la misma forma se cribaron los análogos por probabilidad hemolítica. Luego, se conservaron solo los análogos con estructura similar a CZS-1 o con mayor tendencia a α -hélice.

En la segunda etapa de diseño, se combinaron las modificaciones en la cara polar y no polar de los análogos cribados anteriormente para generar nuevos análogos con mayor potencial antimicrobiano y menor efecto hemolítico. De la misma forma, los nuevos análogos se filtraron por actividad antimicrobiana y potencial hemolítico. Por último, se utilizó PredAPP para predecir la actividad antiparasitaria y descartar aquellos con menor potencial que el análogo [K4K15] CZS-1, diseñado por Bermúdez [13]. Finalmente, se obtuvieron los análogos más prometedores de cada estrategia.

La estructura de los análogos prometedores se dilucidó con tres herramientas bioinformáticas diferentes para mayor soporte. Para la predicción de estructura secundaria se utilizó CFSSP y Jpred4 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). Las secuencias se modelaron en 3D con I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). Los análogos con mayor tendencia a estructura α -hélice en las tres herramientas se evaluaron *in silico* con herramientas de acoplamiento molecular.

2.1.4 Acoplamiento molecular

Con el fin de elucidar el mecanismo de acción de los análogos potenciales, se realizó simulaciones de acoplamiento molecular con membranas. Se usaron las estructuras tridimensionales de los análogos obtenidos en I-TASSER y se verificó la calidad de la estructura mediante el gráfico Ramachandran generado por UCSF Chimera. También se utilizó UCSF Chimera para preparar la estructura de la membrana bacteriana (PDB: 2W6D) y humana (PDB: 2MLR). La energía de interacción del acoplamiento se expresó como afinidad (kcal/mol) y fue obtenida con AutoDock Vina (v.1.2.5).

2.1.5 Síntesis de análogos

La síntesis de los péptidos más prometedores se llevó a cabo mediante síntesis química usando la estrategia Fmoc en el Sintetizador Automático por microondas Liberty Blue (CEM). Para la síntesis de péptidos amidados se utilizó la resina Fmoc Rink Amide (HL). Después se usó piperidina al 20% para desproteger los grupos amino y para la formación de enlaces amidas se utilizó diisopropilcarbodiimida (DIC) y base oxyma. Después, se realizó un lavado con dimetilformamida (DMF). Finalmente, se clivó el péptido del soporte sólido y se lavó usando una solución ácida (TFA 92.5%, agua 2.5%, TIPS 2.5% y DODT 2,5%) durante 30 min a 38 °C [16]. El péptido se precipitó con éter dietílico. La muestra se liofilizó. Este procedimiento se realizó para cada péptido. Finalmente, la masa molecular del péptido fue corroborada mediante MALDI TOF-MS. Para ello, se dispensó 1 µl de matriz α-CHCA (10mg/mL). Una vez seca la matriz, se colocó 1 µl de muestra. Se dejó secar nuevamente, antes de la lectura en el equipo. Para los siguientes ensayos tanto los análogos como cruzioseptina-1 fueron utilizados tal cual salieron del sintetizador, con una pureza del 65%.

2.1.6 Ensayos exploratorios de sensibilidad microbiana

Se evaluó el potencial antimicrobiano en modelos estándar *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* resistente a ampicilina. Los microorganismos fueron incubados a 37 °C en Muller Hinton Broth (MHB) hasta alcanzar su fase de crecimiento logarítmica (1×10^8 UFC/mL para bacterias y 1×10^5 UFC/mL para levaduras). Después, se diluyeron 200 µL de cada microorganismo, excepto la levadura, en 19.8 mL de MHB. Se sembraron 150 µL de cada microorganismo en placas

petri con Muller Hilton Agar. Cada placa se dividió en 5 secciones y se realizaron 3 hoyos en cada una con ayuda de la punta de una pipeta Pasteur previamente esterilizada para cada microorganismo. Se realizaron ensayos exploratorios utilizando 2 μ L del péptido diluido en DMSO a la concentración de 512 mg/mL, concentración con actividad antimicrobiana ya reportada para cruzioseptina. Se colocó 2 μ L del péptido en cada hoyo del agar y se incubaron por 18h a 32°C. En cada placa se usó como control positivo 1 mg/mL de ampicilina para las bacterias, fluconazol para la levadura, gentamicina para la cepa resistente y como control negativo DMSO.

3 CAPITULO III: Resultados

3.1 Biblioteca de análogos

Cada estrategia generó una biblioteca de análogos dividida en modificaciones en la cara polar y no polar. Consecuentemente, los cribados redujeron considerablemente la cantidad de análogos no deseables (Figura 1-3) hasta conservar los más prometedores (Tabla 1-3).

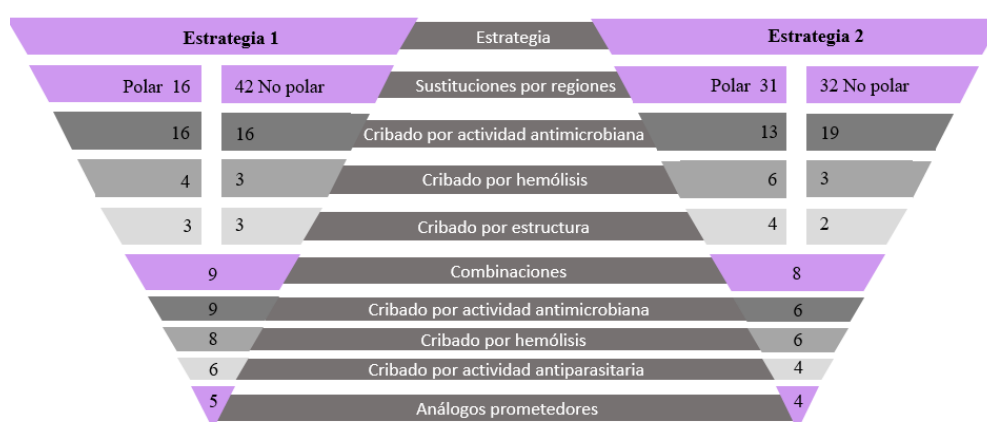


Figura 1-3. Esquema de método de selección de análogos prometedores mediante cribados. Los niveles violetas representan las secciones que generan análogos, mientras que los niveles grises denotan el filtrado de péptidos. El número de análogos resultantes o generados se muestran en cada nivel de las pirámides.

Realizado por: Sosa, 2023.

Las bibliotecas de análogos sin cribar se analizaron para evaluar la tendencia de actividad de cada estrategia. En todas las estrategias los análogos tienden a ser 99% antibacterianos, especialmente los análogos catiónicos se centran en una probabilidad del 100% (Figura 2-3 a). Con respecto a la actividad antifúngica, ambas estrategias generan análogos con mayor probabilidad de inhibir su crecimiento $\geq 97\%$, aunque los análogos de la estrategia 2 con sustituciones en la cara no polar no muestran una tendencia definida (Figura 2-3 b). En otro sentido, la predicción del efecto hemolítico demuestra que los análogos diseñados son más hemolíticos que cruzioseptina-1 ($>60\%$), aunque se rescata que la distribución de los análogos generados por modulación de hidrofobicidad también se acentúa en 50% (Figura 2-3 c).

3.1.1 Estrategia 1: Análogos con modificaciones fisicoquímicas

Se generó una biblioteca con modificaciones en la cara polar (Anexo 2) y la cara no polar (Anexo 5) que generaron 16 y 42 análogos, respectivamente. El proceso de cribado (Anexo 2-7) redujo el número de análogos a 3 con modificaciones en la cara polar y otros 3 modificados en la cara no polar. Una vez combinadas las modificaciones se generaron 9 análogos (Anexo 16). Tras filtrar los análogos combinados quedaron 5 (Tabla 1-3), considerados como prometedores en esta estrategia.

3.1.2 Estrategia 2: Análogos con aminoácidos comunes en PAMs

La segunda estrategia generó similar cantidad de análogos para ambas caras, 31 análogos modificados en la cara polar (Anexo 8) y 32 en la no polar (Anexo 12). Después del filtrado (Anexo 8-15) quedaron 4 análogos modificados en la cara polar y 2 en la no polar. Las combinaciones de modificaciones en ambas caras generaron 8 análogos nuevos, de los cuales 4 fueron los más idóneos (Tabla 1-3).

3.1.3 Análogos prometedores

Ambas estrategias generaron 9 análogos prometedores (Tabla 1-3). De la estrategia 1 se conservaron los análogos con sustituciones de lisinas (en la posición 4,15 y 18) y alanina (en posición 2 y 21). En la estrategia 2, también hubo análogos con modificaciones de lisinas en la posición 4 y 15, aunque al igual en la posición 5 y 8. Tres de los cuatro análogos prometedores generados por la segunda estrategia poseen sustituciones en la posición 2 por leucina.

En ambas estrategias se generaron análogos con carga mayor e hidrofobicidad menor al modelo (Tabla 2-3). Los valores de carga de los análogos oscilan entre +4 a +7. Los valores de hidrofobicidad se mantienen dentro del rango 0.566-0.408. Por otra parte, las estructuras de los análogos son más propensas a formar una α -hélice (>48 %).

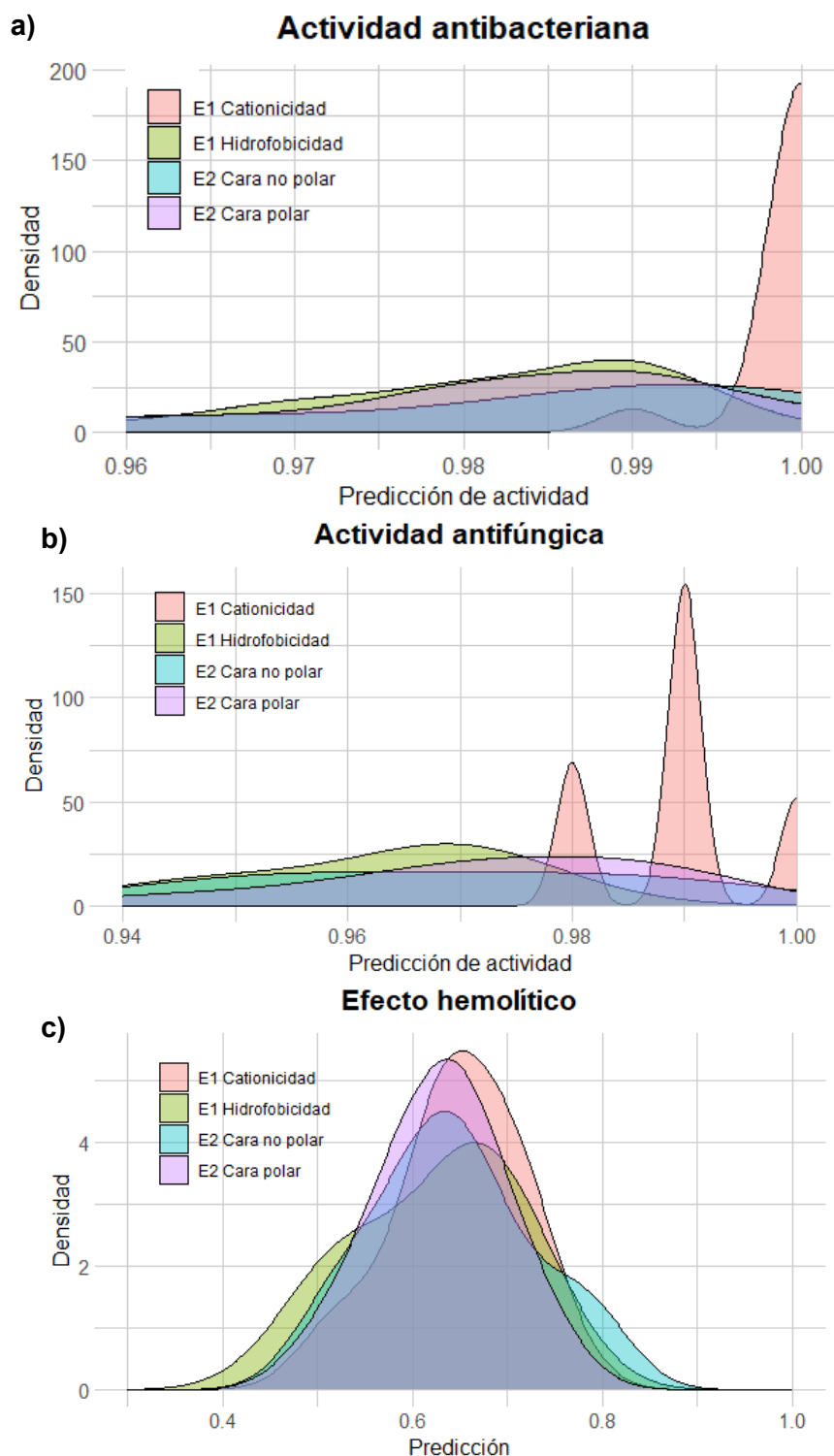


Figura 2-3. Distribución de predicción de análogos de cada estrategia. a) Predicción de actividad antimicrobiana. b) Predicción de actividad antifúngica. c) Predicción de efecto hemolítico. El eje x representa la escala de predicción donde 1 corresponde a 100% de probabilidad y 0 a ninguna probabilidad. El eje Y representa la densidad de datos que poseen esa probabilidad, es una escala de acorde al Estimador de Densidad de Kernel. E1 corresponde a modificaciones de la estrategia 1 y E2 a las modificaciones de la estrategia 2.

Realizado por: Sosa, 2023.

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

Péptido	Secuencia	Estrategia
CZS-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF-NH2	Modelo
2A18K	GALDIVKGVGKVALGAVKKLF-NH2	1
2A4K18K	GALKIVKGVGKVALGAVKKLF-NH2	1
21A4K18K	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLA-NH2	1
21A4K15K18K	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLA-NH2	1
2A4K15K18K	GALKIVKGVGKVALKAVKKLF-NH2	1
2L4K	GLLKIVKGVGKVALGAVSKLF-NH2	2
2L8K	GLLDIVKVGKVALGAVSKLF-NH2	2
2L15K	GLLDIVKGVGKVALKAVSKLF-NH2	2
4K5K	GFLKKVKGKVALGAVSKLF-NH2	2

Realizado por: Sosa, 2023

Tabla 2-3. Propiedades fisicoquímicas de los análogos prometedores. Los valores fueron obtenidos con HeliQuest. La helicidad se midió con PRABI.

Estrategia	Péptido	Masa (g/mol)	Carga a pH 7,4	Hidrofobicidad	Helicidad (%)
Modelo	CZS-1	2117,58	3	0,581	47,62
1	2A18K	2082,57	4	0,465	71,43
1	2A4K18K	2095,66	6	0,455	52,38
1	21A4K18K	2095,66	6	0,455	57,14
1	21A4K15K18K	2166,78	7	0,408	85,71
1	2A4K15K18K	2166,78	7	0,408	85,71
2	2L4K	2096,64	5	0,566	57,14
2	2L8K	2154,68	4	0,53	80,95
2	2L15K	2154,68	4	0,53	85,71
2	4K5K	2145,68	6	0,438	71,43

Realizado por: Sosa, 2023

Tabla 3-3. Predicción de actividad de los análogos. Los valores representados en la tabla son probabilidades donde 1 corresponde al 100%

Estrategia	Péptido	Antibacterial ^a	Antifúngica ^a	Antiparasitaria ^b	Hemolítico ^c
Modelo	CZS-1	0,98	0,96	0,870	0,6
1	2A18K	1	0,98	0,930	0,45
1	2A4K18K	1	0,99	0,936	0,45
1	21A4K18K	1	0,99	0,924	0,45
1	21A4K15K18K	1	0,99	0,925	0,5
1	2A4K15K18K	1	0,99	0,937	0,5
2	2L4K	1	0,99	0,936	0,53
2	2L8K	1	0,99	0,928	0,48
2	2L15K	1	0,99	0,925	0,48
2	4K5K	1	0,99	0,931	0,51

^a Valores obtenidos con iAMPred.

^b Probabilidad antiparasitaria con ParaPred.

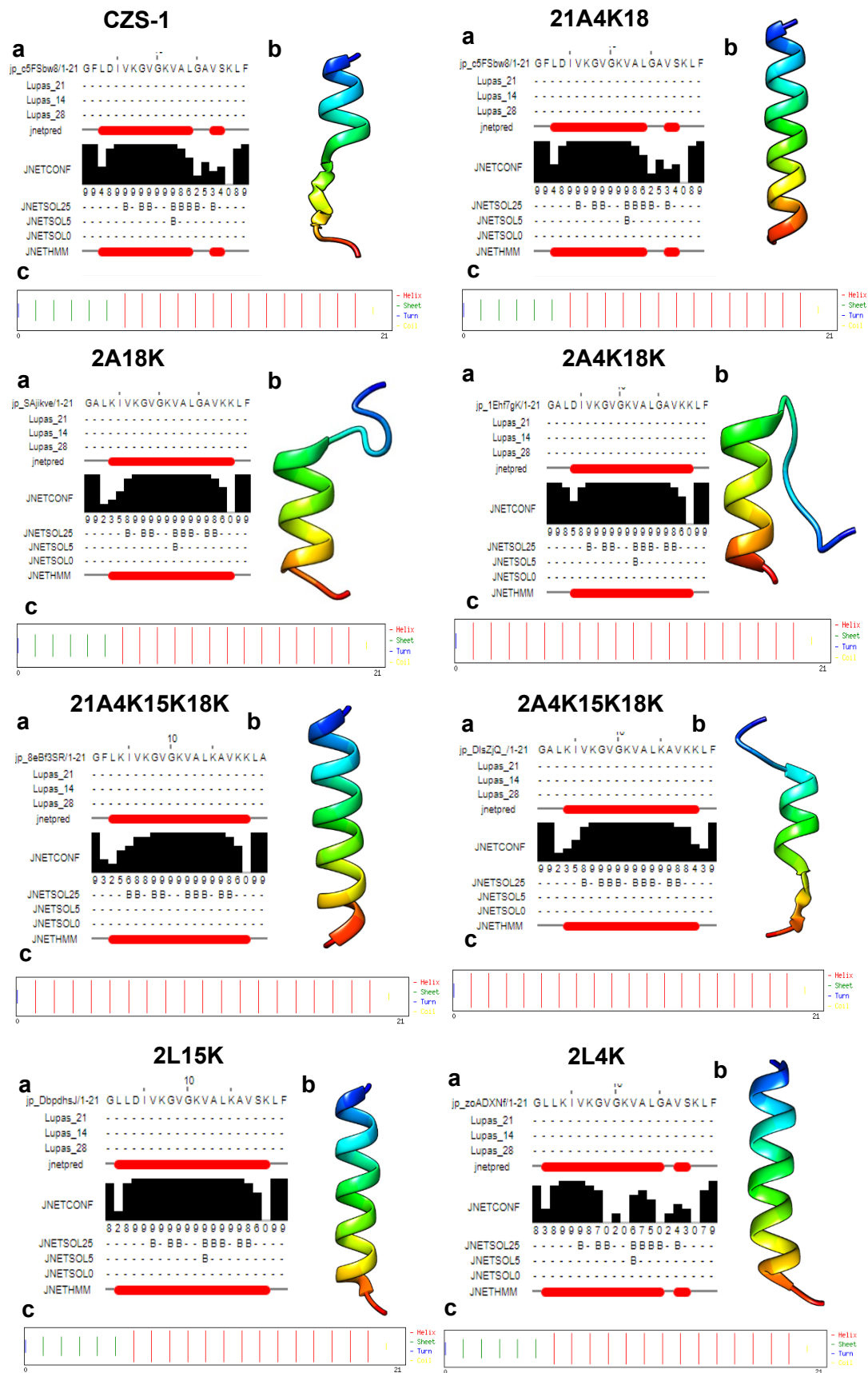
^c Predicción de efecto hemolítico producida por HemoPI.

Realizado por: Sosa, 2023.

Con respecto a la predicción de actividad de los análogos (Tabla 3-3), se prevé que todos inhibirán el crecimiento bacteriano mientras aumenta ligeramente la probabilidad de ser antifúngicos (≥ 0.98) y antiparasitarios con respecto al modelo CZS-1. En otro sentido, su probabilidad de producir efecto hemolítico oscila entre 0.45 a 0.53.

3.2 Modelamiento estructural

Se usaron 3 predictores para dilucidar la estructura de los análogos prometedores, dos para la estructura secundaria (Figura 3-3 a y c) y uno para el modelo 3D (Figura 3-3 b). La representación visual de CFSS manifiesta una estructura similar o más helicoidal para todos los análogos en contraste con el modelo. En general las predicciones de JPred4 expresan la tendencia helicoidal en los análogos diseñados con alta confianza (valor 9), a excepción de 4K5K. Es más, el diseño 4K5K contrasta con el modelo 3D generado por I-TASSER, que presenta un esqueleto helicoidal menos definido solo en el centro. Cuatro de los 9 análogos no mostraron helicidad en toda la estructura tridimensional, aunque se predijo la tendencia helicoidal para la estructura secundaria. Por ello, los análogos 21A4K18K, 2A4K15K18K, 2L4K y 4K5K se descartaron.



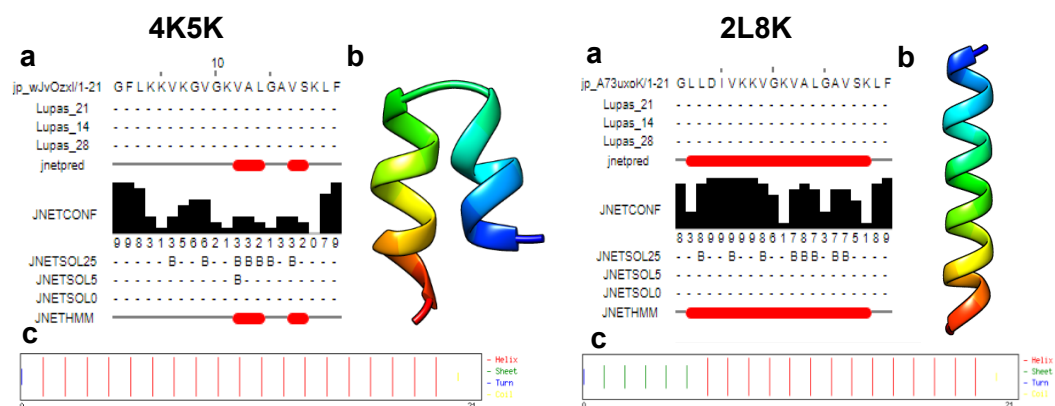


Figura 3-3. Predicción de estructura de análogos prometedores. Se expone la estructura secundaria generada por JPred4 (a), donde los tubos rojos representan hélices y en JNETCONF se estima la confianza para la predicción, el valor más alto de confianza es 9. En el modelo tridimensional de cada análogo generado por I-TASSER (b), el borde azul representa el extremo N-terminal y el rojo el C-terminal. Otra predicción de la estructura es producida por CFSS (c).

Realizado por: Sosa, 2023.

A pesar de ello, todos los análogos generados mostraron mayor tendencia a formar una estructura hélice comparados con CZS-1. Los análogos 2A18K, 2L15K y 2L8K muestran similitud con CZS-1 en la predicción de estructura secundaria (Figura 3-3 c). Por otro lado, los análogos 21A18K y 21A4K15K18K manifiestan mayor tendencia helicoidal comparada con el modelo. De estos análogos, 21A4K15K18K y 2L15K coinciden con aquellos cuyo porcentaje de helicidad (Tabla 2-3) es el más alto correspondiente a 85.71%. Además, el diagrama de rueda helicoidal muestra que los dos análogos conservan su naturaleza anfipática, similar al modelo (Figura 4-3).

Otra forma de representación de estructura es el diagrama helicoidal (Figura 4-3), donde se observa la proyección axial dimensional de una α -hélice. De esta manera, se identifican los cambios de aminoácidos y se diferencia la cara hidrofóbica de la hidrofílica. El análogo 21A4K15K18K posee mayormente lisinas en su cara hidrofílica y se sustituyó la fenilalanina (F) por un aminoácido más neutro, la alanina. En cambio, el análogo 2L15K posee menos cambios en la cara hidrofílica conservando la serina (S) y el ácido aspártico (D).

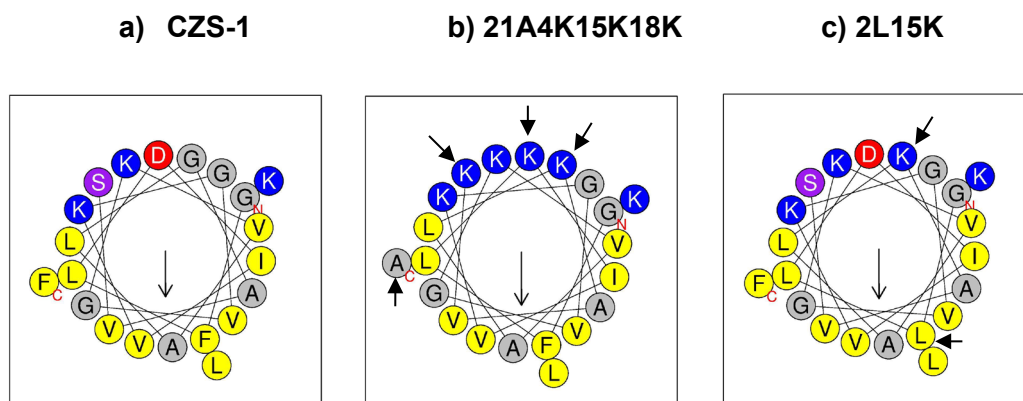


Figura 4-3. Diagrama de rueda helicoidal de a) cruzioseptina-1, b) análogo 21A4K15K18K y c) análogo 2L15K. La flecha hacia abajo en el centro indica la cara hidrofóbica de los péptidos. Los aminoácidos reemplazados están señalados con flechas.

Realizado por: Sosa, 2023.

Se evaluó la calidad de los modelos 3D de CZS-1, 2L15K y 21A4K15K18K mediante el gráfico de Ramachandran. Este gráfico describe las conformaciones de la estructura secundaria de proteínas basada en los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ). Cada aminoácido se representa como un punto y las regiones están delimitadas por curvas de nivel (Figura 5-3) favorables (verde oscuro 0.02), permisivas (verde claro 0.0005) e inadmisibles por impedimento estérico (blanco). Existen 3 regiones delimitadas como favorables, dos grandes sectores a la izquierda y otra más pequeña a la derecha del gráfico. Las regiones que corresponden a una conformación α -hélice se encuentran en la zona céntrica del gráfico (-60 a 60 en el eje psi), la izquierda corresponde a hélices levógiras y la derecha a dextrógira.

De acuerdo al gráfico, los análogos se encuentran, mayormente, en áreas favorables para la conformación α -hélice. La CZS-1 presenta residuos tanto en regiones dextrógira como levógira, también presenta un par de residuos en zonas desfavorables. Consecuentemente la estructura tridimensional de CZS-1 no está tan definida como hélice en comparación con los análogos. En cambio, los análogos se encuentran predominantemente en la región levógira, solo 2L15K presenta un residuo con tendencia de hoja β (sector favorable superior). Debido al consenso de residuos en zonas favorables, se usaron los modelos tridimensionales para el acoplamiento molecular.

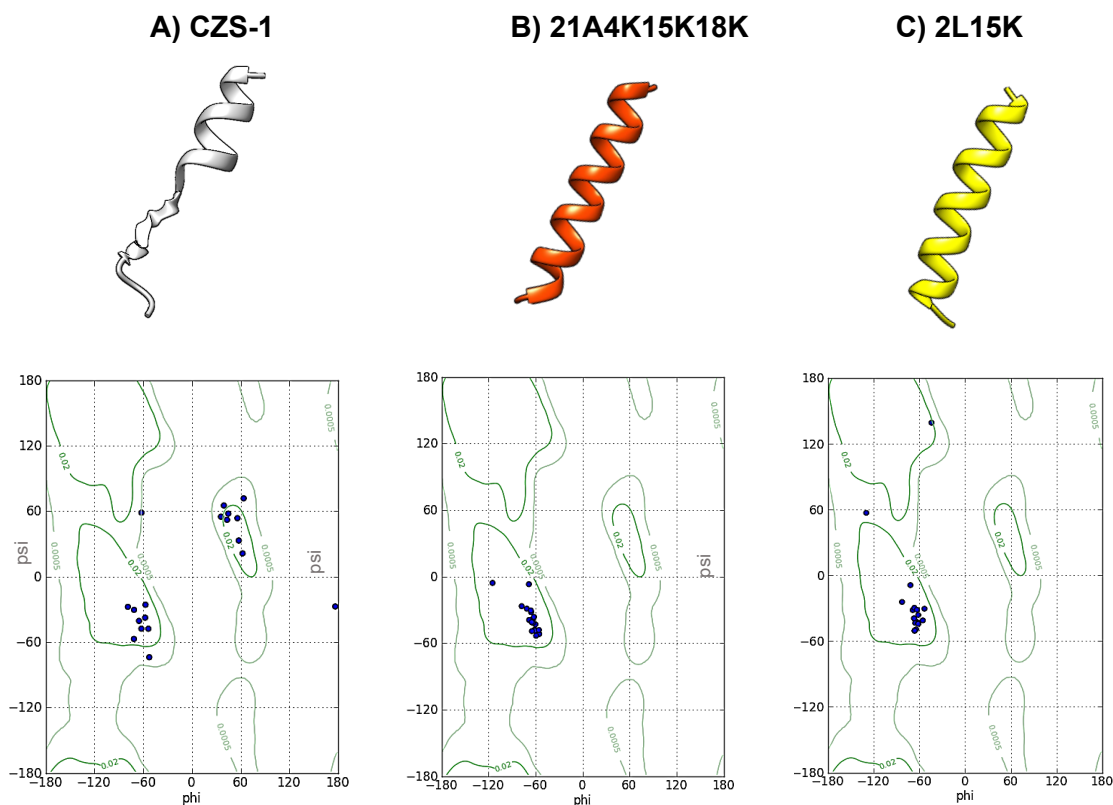


Figura 5-3. Modelos 3D de cruzioseptina-1 (a), análogo 21A4K15K18K (b), análogo 2L15K (c) y gráfico de Ramachandran. CZS-1 posee tendencia α -helicoidal solo en el extremo N-terminal mientras que los análogos muestran tendencia helicoidal en toda la estructura.

Realizado por: Sosa, 2023.

3.3 Acoplamiento molecular

La simulación de interacción péptido-membrana mediante acoplamiento molecular evidencia la inserción de los péptidos en la membrana bacteriana (Figura 6-3 a). Sin embargo, la interacción con la membrana humana se presenta solo en la superficie celular, sin llegar a penetrarla (Figura 6-3 b). Los valores de afinidad de los análogos son mayores que cruzioseptina-1, tanto para la membrana bacteriana como la humana (Tabla 4-3).

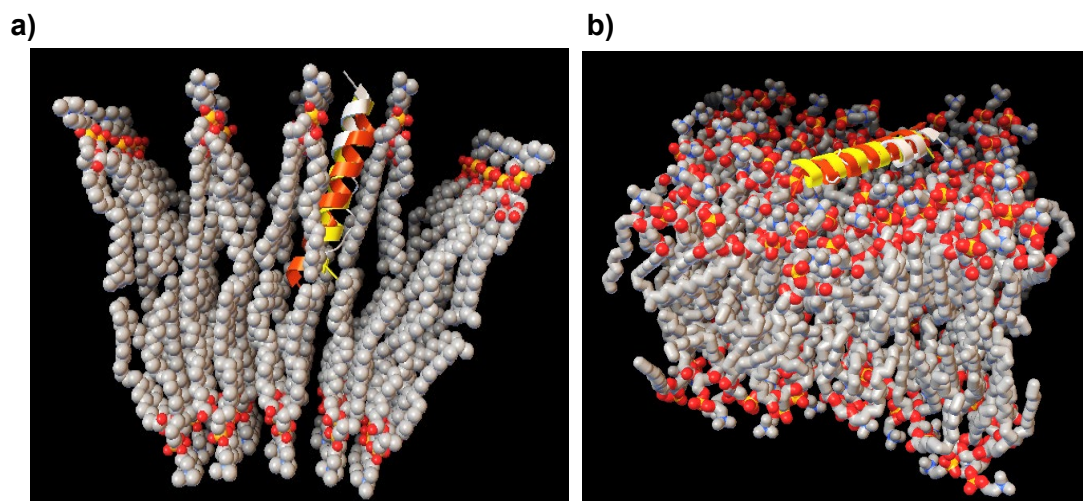


Figura 6-3. Acoplamiento molecular de CZS-1 (gris), 21A4K15K18K (naranja), 2L15K (amarillo) con membrana bacteriana (a) y membrana humana (b). Los análogos se insertan en la membrana bacteriana. En la membrana humana los análogos se quedan en la superficie y no la penetran.

Realizado por: Sosa, 2023.

Tabla 4-3. Valores de afinidad entre membranas y análogos.

Péptido	Valor de afinidad (kcal/mol)	
	Membrana celular bacteriana	Membrana celular humana
	(PDB:2W6D)	(PDB:2MLR)
CZS1	-0,8758	-3,728
21A4K15K18K	-3,889	-3,97
2L15K	-4,884	-4,131

Nota: La magnitud del valor negativo de la afinidad indica la fuerza de la interacción entre el péptido y la membrana. Cuanto más negativo sea el valor, más fuerte será la interacción.

Realizado por: Sosa, 2023

3.4 Sensibilidad microbiana

La actividad antimicrobiana de los péptidos (Tabla 5-3) fue determinada contra cepas Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistente), una cepa Gram positiva (*S. aureus*) y una cepa fúngica (*C. albicans*). Los análogos mostraron mayor diámetro de inhibición contra *E. coli*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* resistente, siendo 15,2 mm el tamaño más grande generado por 21A4K15K18K contra la cepa resistente a

ampicilina. En cambio, el tamaño del halo de inhibición generados por los análogos disminuyó ≥ 2 mm para *S. aureus* y *P. aeruginosa* en comparación con CZS-1.

Tabla 5-3. Ensayo de sensibilidad microbiana en agar.

	Zona de inhibición (mm)					
	Péptido			Antibiótico		
	512 mg/mL			1 mg/mL		
	CZS-1	21A4K1518K	2L15K	Ampicilina	Fluconazol	Gentamicina
<i>E. coli</i>	9,5	10,5	10,6	18,2	-	-
<i>S. aureus</i>	13,0	11,5	10,0	18,0	-	-
<i>C. albicans</i>	7,0	8,74	7,62	-	20,0	-
<i>P. aeruginosa</i>	12,1	10,2	10,2	15,4	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	12,8	15,2	13,2	-	-	23,6

Nota: El DMSO utilizado como control negativo no inhibió el crecimiento microbiano en ninguna de las cepas testeadas, el tamaño de hoyo fue 1,5 mm. El signo (-) indica que el antibiótico no fue usado contra la cepa.

Realizado por: Sosa, 2023

4 CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Estrategias de diseño

Los PAMs son prometedores como agentes terapéuticos gracias a su actividad de amplio espectro, sin embargo, debido a su toxicidad e inestabilidad no superan las pruebas clínicas. Las estrategias de diseño racional generan análogos aptos para ser evaluados *in vitro* y descartar aquellos que presenten limitaciones.

Las estrategias de diseño utilizadas en este estudio generaron análogos con mayor probabilidad de inhibir el crecimiento microbiano (Figura 2-3). Sin embargo, la mayoría de los análogos generados son propensos a ser más hemolíticos. Las modificaciones en la cara polar como en la cara no polar mantienen o aumentan las probabilidades de actividad. Adicionalmente, en la estrategia 1 el aumento de cationicidad incrementó significativamente la probabilidad de inhibir el crecimiento microbiano en comparación con las otras estrategias. Las predicciones de iAMPred muestran que son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano y presentan capacidad antifúngica $\geq 98\%$, valores superiores al modelo cruzioseptina-1. La relación entre la actividad y el efecto hemolítico se explica mediante su mecanismo de acción y la atracción hacia membranas por contacto electrostático [24,44]. Aunque incrementa la actividad de los péptidos diseñados, la selectividad hacia células eucariotas es una característica indeseable en los PAMs.

Por ello, se realizaron combinaciones entre las modificaciones en la cara polar y no polar de cada estrategia que tuvieran las mejores predicciones tanto de actividad antimicrobiana como efecto hemolítico, de esta manera se aumenta la selectividad de los análogos [45]. Se obtuvieron 9 análogos de la primera estrategia (Anexo 16) y 8 de la segunda (Anexo 17), los cuales también fueron cribados por actividad antibacteriana, efecto hemolítico y estructura. El proceso de cribado redujo significativamente el número de análogos de 138 (Anexo 2, 5, 8 y 12) a 9, entre ambas estrategias.

4.2 Caracterización de análogos prometedores

Los 9 péptidos prometedores son las secuencias que poseen las propiedades fisicoquímicas idóneas para inhibir el crecimiento microbiano sin aumentar el efecto hemolítico. Parámetros como la carga neta positiva, hidrofobicidad y helicidad han mostrado ser capaces de modular la actividad antibiótica de péptidos [24,46]. El servidor HELIQUEST ha sido una herramienta eficaz para determinar los parámetros fisicoquímicos de péptidos antimicrobianos [5,13,14,47]. También, se ha manejado PRABI para describir la helicidad de péptidos en investigaciones asociadas al modelado estructural [31,32].

Con respecto a la predicción de actividad (Tabla 3-3), los análogos prometedores exhiben probabilidades similares de ser antimicrobianos. Por otro lado, los análogos con menor predisposición hemolítica son generados por la estrategia 1, destacan 2A18K, 2A4K18K, 21A4K18K. Consecuentemente con sus propiedades fisicoquímicas, en la estrategia 2 los análogos 2L8K y 2L15K poseen menor capacidad de inducir hemólisis. Aunque las herramientas bioinformáticas de predicción de actividad son útiles para el descarte y selección de análogos prometedores sus valores reflejan probabilidades, que pueden cumplirse o no en ensayos *in vitro*. En el diseño de análogos inspirados en CZS-1 llevado a cabo por Bermúdez y colaboradores, de 3 análogos que mostraban predisposición antimicrobiana > 80% solo uno mostró mayor bioactividad que el modelo (K4K15) en ensayos *in vitro* [16]. Cabe mencionar que los valores de predicción por iAMPred del análogo K4K15 fueron del 100% tanto para la actividad antibacteriana como antifúngica.

De la estrategia 1, 21A4K15K18K y 2A4K15K18K son los análogos más catiónicos (+ 7) con menor hidrofobicidad (0.408). En cambio, de la estrategia 2 los análogos 2L15K y 2L8K son menos catiónicos (+4) con mayor hidrofobicidad (0.53). En ambas estrategias los análogos no sobrepasan el límite de cationicidad (+9) favoreciendo la especificidad por la membrana microbiana sin aumentar la afinidad por el huésped [19]. La hidrofobicidad de los análogos es menor que la de cruzioseptina-1, se ha evidenciado que la reducción de esta característica conduce a la disminución del efecto hemolítico [16,48,49]. Las características mencionadas son consistentes con las propiedades de otros análogos diseñados a partir de cruzioseptina-1 [16], sin embargo, un factor distintivo del análogo más bioactivo K4K15 fue su estructura helicoidal más definida en comparación con otros análogos y el modelo.

Los análogos 21A4K15K18K, 2A4K15K18K y 2L15K son los que poseen mayor tendencia helicoidal (85.71%). La estructura helicoidal de los péptidos está directamente relacionada con el incremento de actividad antimicrobiana debido a la tendencia de formar poros [5,46,47]. El mecanismo de acción de lisis celular reduce significativamente la aparición de resistencia bacteriana, lo cual convierte a los péptidos en una alternativa potencial a los fármacos convencionales [50]. Además, los puentes de hidrógeno que conforman la estructura α -hélice son lo suficientemente fuertes entre sí para mantener la estructura en condiciones fisiológicas. Es por ello, que se seleccionaron aquellos que, en consenso con las herramientas bioinformáticas, presentan estructura definida de α -hélice. Los péptidos diseñados 21A4K15K18K y 2L15K fueron elegidos para realizar simulaciones de acoplamiento molecular con membranas.

4.3 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una predicción asistida por computadora de la geometría de unión entre dos moléculas usando algoritmos informáticos [51]. Los cambios conformacionales tras la interacción entre las moléculas pueden ser rígido o flexible, dependiendo del comportamiento de la molécula. 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 [52]. Además, se utilizó el software Autodock Vina, que ha sido utilizado en otras investigaciones para realizar el acoplamiento molecular de péptidos antimicrobianos [13,31,32,53].

Los resultados de acoplamiento molecular revelan que los péptidos diseñados se comportan de forma similar a CZS-1 (Figura 6-3). Se observa la inserción de los análogos en la membrana bacteriana, dilucidando así, su mecanismo membranólítico. Además, los péptidos diseñados 21A4K15K18K y 2L15K presentan valores significativamente más negativos que el modelo, de -3.88 y -4.88 kcal/mol respectivamente. Lo cual indica que la interacción de los análogos con la membrana bacteriana es más fuerte y resistente a la disociación. En otro sentido, los diseños manifestaron mayor afinidad por la membrana humana CZS-1, correspondiendo -3.97 kcal/mol a 21A4K15K18K y -4.131 kcal/mol a 2L15K. Sin embargo, la interacción entre los péptidos y la membrana humana se observa solo en la superficie de la membrana, sin llegar a penetrarla. Tal resultado se explica por las fuertes interacciones

electrostáticas entre los análogos catiónicos y las cabezas de los fosfolípidos aniónicos, impidiendo su inserción en la bicapa [5]. De esta forma, se infiere la disminución del efecto hemolítico provocado por los análogos.

Resultados semejantes fueron expuestos en la investigación de Cuesta, *et al.* [32], donde mostraron la interacción de otras cruzioseptinas solo con la superficie de la membrana humana. Las cruzioseptinas estudiadas (CZS-1, CZS-2, CZS-3, CZS-16, CZS-17) presentaron efecto hemolítico de moderado a bajo experimentalmente [14,32]. También se insertaron en la membrana bacteriana en simulaciones de acoplamiento molecular e inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*.

El acoplamiento molecular es capaz de identificar la conformación bioactiva correcta de los ligandos, en este caso los péptidos, debido a que el aspecto conformacional del proceso está bien optimizado [54–56]. Por ello, se puede inferir que las modificaciones en los análogos han aumentado el potencial antibacteriano contribuyendo a la lisis celular. Aunque los resultados sugieren que los péptidos diseñados no penetran la membrana humana si se estima una fuerte interacción con la superficie, lo cual, puede afectar su permeabilización e inducir citotoxicidad en células humanas.

4.4 Actividad antimicrobiana de análogos prometedores

Aunque el enfoque principal de la investigación es utilizar herramientas bioinformáticas tanto para predecir cómo evaluar el potencial citotóxico, se realizó ensayos exploratorios de susceptibilidad microbiana con los análogos más prometedores 21A4K15K18K y 2L15K, para brindar mayor apoyo a los resultados y esclarecer su potencial antimicrobiano para futuras investigaciones.

Cruzioseptina-1 fue usada como estructura para el diseño de análogos por su actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*. Ambos análogos también muestran actividad antimicrobiana contra esas cepas, pero solo se expresó mayor inhibición que CZS-1 para *E. coli* y *C. albicans*. Además, se testeó el potencial contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistente a ampicilina, actividad aún no reportada para cruzioseptinas. En este caso los péptidos diseñados solo mostraron mayor inhibición contra *K. pneumoniae*. La diferencia de actividad entre las cepas se debe a la diferente composición de las membranas microbianas, que cambia incluso entre cepas de la

misma especie [13]. Otro factor que influye son las enzimas proteolíticas existentes en la superficie de la membrana que pueden lisar los péptidos antes de su inserción.

Destaca la actividad de 21A4K15K18K por exhibir el tamaño de halo más grande que inhibe el crecimiento en 3 de las 5 cepas testeadas. El incremento de actividad se atribuye a la cationicidad mayor con respecto al modelo (de +3 a +7). El aumento de carga favorece la inserción del péptido en la membrana microbiana, mediante la interacción electrostática de las cadenas laterales de los aminoácidos catiónicos y las cabezas aniónicas de los fosfolípidos [5,19].

El reemplazo de glicinas por lisinas, además de incrementar la carga, fomenta la adquisición de la conformación α -hélice. Investigaciones han demostrado que análogos con mayor proporción de glicinas son menos potentes causando menor disrupción en la membrana bacteriana, a pesar de dotar a la estructura de mayor flexibilidad [57]. Las sustituciones por alanina en análogos de indolicina han demostrado mejorar la actividad antimicrobiana por adoptar conformación helicoidal [58]. En este mismo sentido, sustituciones simultáneas de lisina y alanina en análogos de pardaxina exhiben el mismo comportamiento, aunque también se eleva el efecto hemolítico [59].

De igual manera, el diseño 2L15K inhibe el crecimiento microbiano más que cruzioseptina-1. En este caso se sustituyó una fenilamina de la secuencia de CZS-1 por una leucina, una molécula más soluble en agua. La fenilalanina posee un grupo aromático que es más hidrofóbico que el grupo alifático de la leucina, lo cual promueve la solubilidad del péptido y facilita su penetración en membranas. Al igual que en el otro análogo la sustitución de glicina por lisina, aumenta el contacto electrostático entre el péptido y la membrana microbiana.

Se ha demostrado que las sustituciones con lisina y leucina simultáneas incrementan levemente la actividad antimicrobiana mientras disminuyen considerablemente el efecto hemolítico [46,60–62]. Aunque el reemplazo por leucina en la cara hidrofóbica mejora la actividad, se ha observado que disminuye la potencia contra cepas Gram positivas [63]. Consecuentemente, péptidos provenientes de la secreción de la piel de ranas que son ricos en leucina y glicina, reportan mayor actividad contra cepas Gram negativas, aunque no exhiben actividad contra *S. aureus* ni *C. albicans* [64].

5 CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El diseño racional de péptidos antimicrobianos genera análogos con potencial terapéutico mediante estrategias que permiten descartar aquellos con propiedades no deseables. Las propiedades fisicoquímicas de los análogos prometedores de ambas estrategias fueron similares: aumentaron la carga, disminuyeron la hidrofobicidad y fomentaron la tendencia α -hélice. Lo que sugiere que son propiedades idóneas para aumentar la actividad antimicrobiana y disminuir el efecto hemolítico. En la presente investigación se utilizaron herramientas bioinformáticas como predictores y simulaciones con membranas. El estudio *in silico* de los análogos 21A4K15K18K y 2L15K muestra mayor afinidad por la membrana bacteriana que el modelo CZS-1, mostrando su inserción en la membrana. La interacción de los análogos con la membrana humana presenta mayor afinidad solo en la superficie. Adicionalmente, los ensayos exploratorios de sensibilidad microbiana mostraron mayor inhibición de los análogos contra *E. coli*, *C. albicans* y *K. pneumoniae* resistente a ampicilina, 21A4K15K18K fue el análogo más potente. El enfoque principal de la investigación fue diseñar análogos con mayor actividad antimicrobiana y menor efecto hemolítico utilizando herramientas bioinformáticas, se recomienda realizar ensayos de concentración mínima inhibitoria y hemólisis con los péptidos purificados para corroborar su potencial citotóxico. Además, se recomienda usar herramientas bioinformáticas para predecir los sitios de escisión por proteasas para estimar su estabilidad en entornos fisiológicos. Existen programas para diseñar péptidos resistentes a proteasas que sugieren modificaciones no proteinogénicas.

Referencias

1. Gutiérrez P, Orduz S. Péptidos antimicrobianos: Estructura, función y aplicaciones. *Actualidades Biológicas*. 2017;25: 1–12. doi:10.17533/udea.acbi.329497
2. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 2010;14: 55–67. doi:10.1016/S0123-9392(10)70093-X
3. Rodríguez AA, Otero-González A, Ghattas M, Ständker L. Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides. *Biomedicines*. 2021;9: 1381. doi:10.3390/biomedicines9101381
4. Aoki W, Ueda M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals*. 2013;6: 1055–1081. doi:10.3390/ph6081055
5. Sánchez Y, Camargo O, Orduz S. Diseño de Péptidos Antimicrobianos Derivados de Dermaseptina S4. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2016. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55719>
6. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. 2010;1: 143–152. doi:10.1007/s13238-010-0004-3
7. Cubillos Berrío JE, Caycedo Lozano L. Los péptidos antimicrobianos y sus propiedades como macromoléculas. Una revisión sistemática. *Biociencias*. 2020;3. Available: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/4406>
8. Muñoz C, Groot de Restrepo H, Mitrani Acrich E, Siano A, Vives Flórez, Martha Josefina. Búsqueda de péptidos antimicrobianos nuevos en secreciones de piel de ranas. Universidad de Colombia. 2017. Available: <http://hdl.handle.net/1992/7707>
9. Park Y-K, Hahm K-S. Antimicrobial Peptides (AMPs): Peptide Structure and Mode of Action. *BMB Rep*. 2005;38: 507–516. doi:10.5483/BMBRep.2005.38.5.507
10. Powers J-PS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (NY)*. 2003;24: 1681–1691. doi:10.1016/j.peptides.2003.08.023
11. Conlon JM, Sonnevend A. Antimicrobial Peptides in Frog Skin Secretions. In: Giuliani A, Rinaldi A, editors. *Antimicrobial peptides*. Totowa, NJ; 2010. pp. 3–14. doi:10.1007/978-1-60761-594-1_1
12. Mangoni ML, Casciaro B. Development of Antimicrobial Peptides from Amphibians. *Antibiotics*. 2020;9: 772. doi:10.3390/antibiotics9110772
13. Bermúdez S. Diseño de nuevos agentes antimicrobianos bioinspirados en el péptido Cruzioseptina-1. Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2021. Available: http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/572
14. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016;146: 1–13. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.017
15. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53: 853–868. doi:10.1007/s00726-021-02986-w
16. Bermúdez-Puga S, Morán-Marcillo G, Espinosa de los Monteros-Silva N, Naranjo RE, Toscano F, Vizúete K, et al. Inspiration from cruzioseptin-1: membranolytic analogue with improved antibacterial properties. *Amino Acids*. 2023;55: 113–124. doi:10.1007/s00726-022-03209-6
17. Mahlapuu M, Björn C, Ekblom J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol*. 2020;40: 978–992. doi:10.1080/07388551.2020.1796576
18. Kang S-J, Park SJ, Mishig-Ochir T, Lee B-J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12: 1477–1486. doi:10.1586/14787210.2014.976613

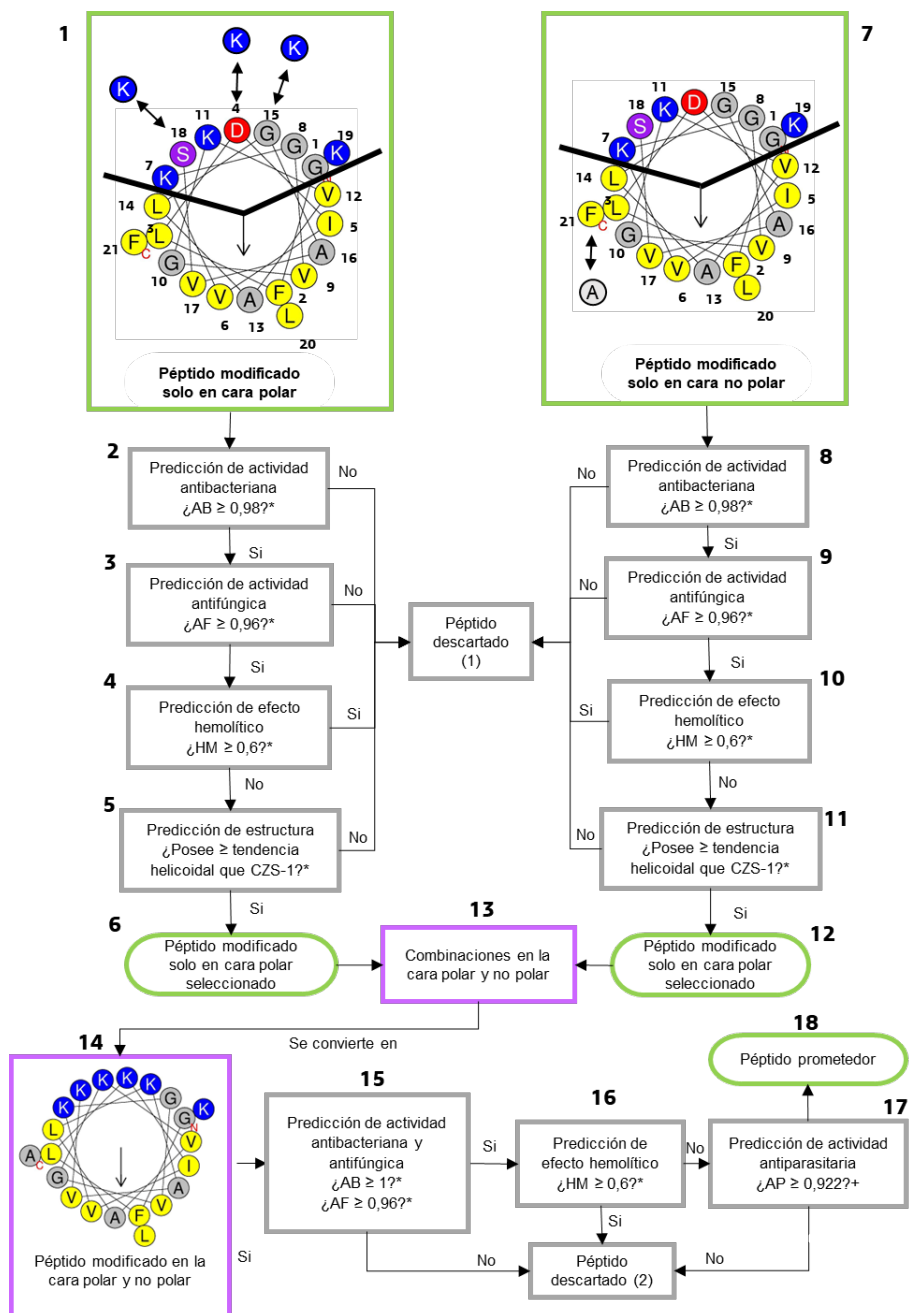
19. Porto W, Silva O, Franco O. Prediction and rational design of antimicrobial peptides. In: Faraggi E, editor. *Protein Structure*. 2012. pp. 377–391.
20. Ortiz López C. Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*. 2019;43: 614–627. doi:10.18257/raccefyn.864
21. Liscano Y, Oñate-Garzón J, Delgado JP. Peptides with Dual Antimicrobial–Anticancer Activity: Strategies to Overcome Peptide Limitations and Rational Design of Anticancer Peptides. *Molecules*. 2020;25: 4245. doi:10.3390/molecules25184245
22. Uggerhøj LE, Poulsen TJ, Munk JK, Fredborg M, Sondergaard TE, Frimodt-Møller N, et al. Rational Design of Alpha-Helical Antimicrobial Peptides: Do's and Don'ts. *ChemBioChem*. 2015;16: 242–253. doi:10.1002/cbic.201402581
23. Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280: 12316–12329. doi:10.1074/jbc.M413406200
24. Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758: 1436–1449. doi:10.1016/j.bbame.2006.03.021
25. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008;24: 2101–2102. doi:10.1093/bioinformatics/btn392
26. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: W174–W181. doi:10.1093/nar/gkv342
27. Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, Markley JL, Nakamura H, Velankar S. Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. 2017. pp. 627–641. doi:10.1007/978-1-4939-7000-1_26
28. Meher PK, Sahu TK, Saini V, Rao AR. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci Rep*. 2017;7: 42362. doi:10.1038/srep42362
29. Chaudhary K, Kumar R, Singh S, Tuknait A, Gautam A, Mathur D, et al. A Web Server and Mobile App for Computing Hemolytic Potency of Peptides. *Sci Rep*. 2016;6: 22843. doi:10.1038/srep22843
30. Fan J, Fu A, Zhang L. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*. 2019;7: 83–89. doi:10.1007/s40484-019-0172-y
31. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquinga F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C, et al. Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog *Agalychnis saltator*. *J Mol Model*. 2019;25: 260. doi:10.1007/s00894-019-4141-1
32. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53: 853–868. doi:10.1007/s00726-021-02986-w
33. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2020;30: 619–635. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004
34. Organización Panamericana de la Salud. La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. 3 Mar 2021 [cited 3 Jan 2024]. Available: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
35. Tamhankar AJ, Stålsby Lundborg C. Antimicrobials and Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Remediation: A Global One Health Perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16: 4614. doi:10.3390/ijerph16234614
36. Tian M, He X, Feng Y, Wang W, Chen H, Gong M, et al. Pollution by Antibiotics and Antimicrobial Resistance in LiveStock and Poultry Manure in China, and Countermeasures. *Antibiotics*. 2021;10: 539. doi:10.3390/antibiotics10050539

37. Machowska A, Stålsby Lundborg C. Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;16: 27. doi:10.3390/ijerph16010027
38. Otte J. Antibiotic Use in Food Animals and Possible Impacts on Human Health. 2016. Available: <https://www.researchgate.net/publication/342707702>
39. Chen CH, Lu TK. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics*. 2020;9: 24. doi:10.3390/antibiotics9010024
40. Barreto-Santamaría A, Patarroyo ME, Curtidor H. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56: 351–373. doi:10.1080/10408363.2019.1631249
41. Barreto-Santamaría A, Patarroyo ME, Curtidor H. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56: 351–373. doi:10.1080/10408363.2019.1631249
42. Tan P, Fu H, Ma X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. *Nano Today*. 2021;39: 101229. doi:10.1016/j.nantod.2021.101229
43. León Siria R. Reposicionamiento de fármacos como estrategia para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Universidad de Sevilla. 2021.
44. Maturana P, Martínez M, Noguera ME, Santos NC, Disalvo EA, Semorile L, et al. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;153: 152–159. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.02.003
45. Wang P, Nan YH, Yang S-T, Kang SW, Kim Y, Park I-S, et al. Cell selectivity and anti-inflammatory activity of a Leu/Lys-rich α -helical model antimicrobial peptide and its diastereomeric peptides. *Peptides (NY)*. 2010;31: 1251–1261. doi:10.1016/j.peptides.2010.03.032
46. Park Y, Lee DG, Jang S-H, Woo E-R, Jeong HG, Choi C-H, et al. A Leu–Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2003;1645: 172–182. doi:10.1016/S1570-9639(02)00541-1
47. Maturana P, Martínez M, Noguera ME, Santos NC, Disalvo EA, Semorile L, et al. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;153: 152–159. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.02.003
48. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;141: 528–536. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
49. Jiang Z, Vasil A, Vasil M, Hodges R. “Specificity Determinants” Improve Therapeutic Indices of Two Antimicrobial Peptides Piscidin 1 and Dermaseptin S4 Against the Gram-negative Pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals*. 2014;7: 366–391. doi:10.3390/ph7040366
50. Zhu X, Zhang L, Wang J, Ma Z, Xu W, Li J, et al. Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity. *Acta Biomater*. 2015;18: 155–167. doi:10.1016/j.actbio.2015.02.023
51. Aliyu A, Ibrahim YKE, Tytler BA, Olowo-okere BA. Antimicrobial Peptide Design, Molecular Docking and ADMET Studies Against the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Carbapenem-resistant and Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends in Peptide and Protein Sciences*. 2022;7. doi:https://doi.org/10.22037/tpps.v7i.39110
52. Xie J, Gou Y, Zhao Q, Wang K, Yang X, Yan J, et al. Antimicrobial activities and membrane-active mechanism of CPF-C1 against multidrug-resistant bacteria, a novel antimicrobial peptide derived from skin secretions of the tetraploid frog *Xenopus clivii*. *Journal of Peptide Science*. 2014;20: 876–884. doi:10.1002/psc.2679
53. Kaur K, Kaur P, Mittal A, Nayak SK, Khatik GL. Design and molecular docking studies of novel antimicrobial peptides using autodock molecular docking software. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017;10: 28. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10s4.21332

54. Warren GL, Andrews CW, Capelli A-M, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, et al. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J Med Chem.* 2006;49: 5912–5931. doi:10.1021/jm050362n
55. Li Y, Han L, Liu Z, Wang R. Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: 2. Evaluation Methods and General Results. *J Chem Inf Model.* 2014;54: 1717–1736. doi:10.1021/ci500081m
56. Pantsar T, Poso A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules.* 2018;23: 1899. doi:10.3390/molecules23081899
57. Rončević T, Vukičević D, Ilić N, Krce L, Gajski G, Tonkić M, et al. Antibacterial Activity Affected by the Conformational Flexibility in Glycine–Lysine Based α -Helical Antimicrobial Peptides. *J Med Chem.* 2018;61: 2924–2936. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01831
58. Powers J-PS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (NY).* 2003;24: 1681–1691. doi:10.1016/j.peptides.2003.08.023
59. THENNARASU S, NAGARAJ R. Design of 16-residue peptides possessing antimicrobial and hemolytic activities or only antimicrobial activity from an inactive peptide. *Int J Pept Protein Res.* 1995;46: 480–486. doi:10.1111/j.1399-3011.1995.tb01603.x
60. Gopal R, Park S, Ha K, Cho SJ, Kim SW, Song PI, et al. Effect of Leucine and Lysine substitution on the antimicrobial activity and evaluation of the mechanism of the HPA3NT3 analog peptide. *Journal of Peptide Science.* 2009;15: 589–594. doi:10.1002/psc.1155
61. Pandit G, Ilyas H, Ghosh S, Bidkar AP, Mohid SkA, Bhunia A, et al. Insights into the Mechanism of Antimicrobial Activity of Seven-Residue Peptides. *J Med Chem.* 2018;61: 7614–7629. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00353
62. Béven L, Castano S, Dufourcq J, Wieslander Å, Wróblewski H. The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class Mollicutes. *Eur J Biochem.* 2003;270: 2207–2217. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03587.x
63. Torres MDT, Pedron CN, da Silva Lima JA, da Silva PI, da Silva FD, Oliveira VX. Antimicrobial activity of leucine-substituted decoralin analogs with lower hemolytic activity. *Journal of Peptide Science.* 2017;23: 818–823. doi:10.1002/psc.3029
64. Sousa JC, Berto RF, Gois EA, Fontenele-Cardi NC, Honório-Júnior JER, Konno K, et al. Leptoglycin: A new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). *Toxicon.* 2009;54: 23–32. doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.011

Anexos

Anexo 1. Diagrama de flujo de selección de análogos prometedores.



Nota: La selección de análogos de cada estrategia se llevó a cabo por cribado basado en la toma de decisiones expresadas en el gráfico. El gráfico está enumerado de manera que se cumpla cada criterio de selección. En caso de no cumplir el péptido será descartado. Si es descartado antes del paso 13, el diagrama inicia (paso 1 o 7) con otro péptido modificado solo en una cara. Los péptidos descartados después del paso 14 no serán seleccionados.

*Los valores de selección se inspiraron en los resultados obtenidos en Bermúdez (2021).

AB: probabilidad de actividad antibacteriana

AF: probabilidad de actividad antifúngica

HM: probabilidad de causar efecto hemolítico

AP: probabilidad de actividad antiparasitaria

Glosario de Anexos

AB: actividad antibacteriana

AF: actividad antifúngica

HM: efecto hemolítico hemolítica

C: carga

HD: hidrofobicidad

EST: estructura

AP: actividad antiparasitaria

M: modelo

A: análogo evaluado *in vitro*

Biblioteca de análogos Estrategia 1

Cara polar

Anexo 2. Análogos generados aumentando la cationicidad.

ESTRATEGIA AUMENTO DE CATIONICIDAD							
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]CZS-1	1	1	0.44	6	0.528
1	KFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	1K	1	0.98	0.63	4	0.531
2	GFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	4K	1	0.99	0.62	5	0.57
3	GFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	8K	1	0.98	0.63	4	0.534
4	GFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	15K	1	0.98	0.63	4	0.534
5	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLF	18K	1	0.99	0.52	4	0.536
6	KFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	1K4K	1	1	0.65	6	0.523
7	KFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	1K8K	1	0.99	0.7	5	0.487
8	KFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	1K15K	1	0.99	0.7	5	0.487
9	KFLDIVKKVGKVALGAVKKLF	1K8K18K	1	0.99	0.72	6	0.441
10	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLF	4K18K	1	1	0.53	6	0.525
11	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	4K8K	1	0.99	0.65	5	0.523
12	GFLDIVKKVGKVALKAVSKLF	8K15K	1	0.99	0.7	5	0.487
13	GFLDIVKKVGKVALGAVKKLF	8K18K	1	0.99	0.6	5	0.489
14	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLF	4K15K18K	1	1	0.64	7	0.478
15	GFLKIVKKVGKVALKAVKKLF	4K8K15K18K	1	0.99	0.75	8	0.431
16	KFLKIVKKVGKVALKAVKKLF	1K4K8K15K18K	1	0.98	0.7	9	0.384

^a Probabilidad de ser antibacteriano (AB) y antifúngico (AF) generada por iAMPred.

^b Probabilidad de inducir hemólisis (HM) producida por HemoPI.

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

Anexo 3. Cribado por efecto hemolítico de análogos catiónicos.

ESTRATEGIA AUMENTO DE CATIONICIDAD						
Cribado por efecto hemolítico						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	HÉLICE
1	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLF	18K	1	0.99	0.52	HÉLICE
2	KFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	1K4K	1	1	0.65	RANDOM
3	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLF	4K18K	1	1	0.53	HÉLICE
4	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLF	4K15K18K	1	1	0.64	HÉLICE

^d Estructura de la secuencia peptídica (EST) predicha por CFSSP.

Anexo 4. Cribado por estructura de análogos catiónicos.

ESTRATEGIA AUMENTO DE CATIONICIDAD								
Cribado por estructura								
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.528	HÉLICE
1	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLF	18K	1	0.99	0.52	4	0.536	HÉLICE
2	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLF	4K18K	1	1	0.53	6	0.525	HÉLICE
3	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLF	4K15K18K	1	1	0.64	7	0.478	HÉLICE

Cara no polar

Anexo 5. Análogos generados modificando la hidrofobicidad.

ESTRATEGIA HIDROFOBICIDAD								
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c	
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581	
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523	
1	GVLDIVKGVGKVALGAVSKLF	2V	0.97	0.91	0.50	3	0.554	
2	GALDIVKGVGKVALGAVSKLF	2A	0.99	0.96	0.53	3	0.51	
3	GFIDIVKGVGKVALGAVSKLF	3I	0.99	0.96	0.65	3	0.51	
4	GFFDIVKGVGKVALGAVSKLF	3F	0.94	0.93	0.62	3	0.585	
5	GFADIVKGVGKVALGAVSKLF	3A	0.98	0.94	0.57	3	0.515	
6	GFVDIVKGVGKVALGAVSKLF	3V	0.94	0.90	0.52	3	0.558	
7	GFLDFVKGVGKVALGAVSKLF	5F	0.92	0.89	0.54	3	0.58	
8	GFLDVVKGVGKVALGAVSKLF	5V	0.93	0.87	0.45	3	0.553	
9	GFLDAVKGVGKVALGAVSKLF	5A	0.97	0.91	0.48	3	0.51	
10	GFLDMVKGVGKVALGAVSKLF	5M	0.94	0.90	0.51	3	0.554	
11	GFLDIMKGVGKVALGAVSKLF	6M	0.99	0.97	0.71	3	0.581	
12	GFLDIAKGVGKVALGAVSKLF	6A	0.99	0.97	0.67	3	0.538	
13	GFLDIWKGVGKVALGAVSKLF	6W	0.98	0.92	0.75	3	0.63	
14	GFLDIGKGVGKVALGAVSKLF	6G	0.99	0.97	0.66	3	0.523	

15	GFLDIVKGMGKVALGAVSKLF	9M	0.99	0.97	0.71	3	0.581
16	GFLDIVKGAGKVALGAVSKLF	9A	0.99	0.97	0.67	3	0.538
17	GFLDIVKGWGKVALGAVSKLF	9W	0.98	0.92	0.75	3	0.63
18	GFLDIVKGGGKVALGAVSKLF	9G	0.99	0.97	0.66	3	0.576
19	GFLDIVKGVHVALGAVSKLF	10H	0.97	0.91	0.56	3	0.593
20	GFLDIVKGVSKVALGAVSKLF	10S	0.98	0.93	0.65	3	0.551
21	GFLDIVKGVKKVALGAVSKLF	10K	1.00	0.98	0.63	3	0.528
22	GFLDIVKGVGKMALGAVSKLF	12M	0.99	0.97	0.71	3	0.552
23	GFLDIVKGVGKAALGAVSKLF	12A	0.99	0.97	0.67	3	0.53
24	GFLDIVKGVGKWALGAVSKLF	12W	0.98	0.92	0.75	3	0.63
25	GFLDIVKGVGKGALGAVSKLF	12G	0.99	0.97	0.66	3	0.523
26	GFLDIVKGVGKVWLAVSKLF	13W	0.94	0.86	0.68	3	0.673
27	GFLDIVKGVGKVPLAVSKLF	13P	0.96	0.93	0.70	3	0.6
28	GFLDIVKGVGKVGLAVSKLF	13G	0.98	0.95	0.63	3	0.566
29	GFLDIVKGVGKVALGWVSKLF	16W	0.94	0.86	0.68	3	0.673
30	GFLDIVKGVGKVALGPVSKLF	16P	0.96	0.93	0.70	3	0.6
31	GFLDIVKGVGKVALGGVSKLF	16G	0.98	0.95	0.63	3	0.566
32	GFLDIVKGVGKVALGAMSKLF	17M	0.99	0.97	0.71	3	0.581
33	GFLDIVKGVGKVALGAASKLF	17A	0.99	0.97	0.67	3	0.538
34	GFLDIVKGVGKVALGAWSKLF	17W	0.98	0.92	0.75	3	0.63
35	GFLDIVKGVGKVALGAVSKIF	20I	0.99	0.96	0.65	3	0.586
36	GFLDIVKGVGKVALGAVSKFF	20F	0.94	0.93	0.62	3	0.585
37	GFLDIVKGVGKVALGAVSKVF	20V	0.94	0.90	0.52	3	0.558
38	GFLDIVKGVGKVALGAVSKAF	20A	0.98	0.94	0.57	3	0.515
39	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLV	21V	0.97	0.91	0.50	3	0.554
40	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLM	21M	0.97	0.93	0.55	3	0.554
41	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLA	21A	0.99	0.96	0.53	3	0.51
42	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLW	21W	0.97	0.88	0.59	3	0.603

Anexo 6. Cribado por actividad antibacteriana y antifúngica.

ESTRATEGIA HIDROFOBICIDAD							
Cribado por actividad antibacteriana y antifúngica							
N°	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523
1	GALDIVKGVGKVALGAVSKLF	2A	0.99	0.96	0.53	3	0.51
2	GFIDIVKGVGKVALGAVSKLF	3I	0.99	0.96	0.65	3	0.51
3	GFLDIMKGVGKVALGAVSKLF	6M	0.99	0.97	0.71	3	0.585
4	GFLDIKGVGKVALGAVSKLF	6A	0.99	0.97	0.67	3	0.515
5	GFLDIGKGVGKVALGAVSKLF	6G	0.99	0.97	0.66	3	0.558
6	GFLDIVKGMGKVALGAVSKLF	9M	0.99	0.97	0.71	3	0.58
7	GFLDIVKGAGKVALGAVSKLF	9A	0.99	0.97	0.67	3	0.553
8	GFLDIVKGGGKVALGAVSKLF	9G	0.99	0.97	0.66	3	0.51
9	GFLDIVKGVKKVALGAVSKLF	10K	1.00	0.98	0.63	3	0.554
10	GFLDIVKGVGKMALGAVSKLF	12M	0.99	0.97	0.71	3	0.581

11	GFLDIVKGVGKAALGAVSKLF	12A	0.99	0.97	0.67	3	0.538
12	GFLDIVKGVGKGALGAVSKLF	12G	0.99	0.97	0.66	3	0.63
13	GFLDIVKGVGKVALGAMSKLF	17M	0.99	0.97	0.71	3	0.523
14	GFLDIVKGVGKVALGAASKLF	17A	0.99	0.97	0.67	3	0.581
15	GFLDIVKGVGKVALGAVSKIF	20I	0.99	0.96	0.65	3	0.538
16	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLA	21A	0.99	0.96	0.53	3	0.63

Anexo 7. Cribado por efecto hemolítico de análogos hidrofóbicos.

ESTRATEGIA HIDROFOBICIDAD								
Cribado por actividad efecto hemolítico								
N°	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523	HÉLICE
1	GALDIVKGVGKVALGAVSKLF	2A	0.99	0.95	0.53	3	0.51	HÉLICE
2	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLA	21A	0.99	0.95	0.53	3	0.63	HÉLICE
3	GFLDIVKGVKKVALGAVSKLF	10K	1.00	0.98	0.63	3	0.554	HÉLICE

Biblioteca de análogos Estrategia 2

Cara polar

Anexo 8. Análogos generados sustituyendo aminoácidos por otros comunes en PAMs.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA POLAR							
N°	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523
1	GFLSIVKGVGKVALGAVSKLF	4S	0.98	0.97	0.7	4	0.616
2	GFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	4K	1	0.99	0.62	5	0.570
3	GFLGIVKGVGKVALGAVSKLF	4G	0.98	0.98	0.64	4	0.618
4	GFLNIVKGVGKVALGAVSKLF	4N	0.99	0.99	0.76	4	0.589
5	GFLRIVKGVGKVALGAVSKLF	4R	0.98	0.98	0.71	5	0.570
6	GFLHIVKGVGKVALGAVSKLF	4H	0.99	0.99	0.64	4.09	0.624
7	GFLTIVKGVGKVALGAVSKLF	4T	0.96	0.97	0.65	4	0.630
8	GFLCIVKGVGKVALGAVSKLF	4C	0.99	0.99	0.7	3.9	0.691
9	GFLDIVGGVGKVALGAVSKLF	7G	0.92	0.82	0.6	2	0.628
10	GFLDIVPGVGKVALGAVSKLF	7P	0.88	0.76	0.66	2	0.628
11	GFLDIVAGVGKVALGAVSKLF	7A	0.94	0.83	0.58	2	0.643
12	GFLDIVRGVGKVALGAVSKLF	7R	0.88	0.84	0.66	3	0.580
13	GFLDIVEGVGKVALGAVSKLF	7E	0.69	0.46	0.58	1	0.598
14	GFLDIVHGVGKVALGAVSKLF	7H	0.97	0.91	0.59	2.09	0.634
15	GFLDIVDGVGKVALGAVSKLF	7D	0.88	0.52	0.49	1	0.591
16	GFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	8K	1	0.98	0.63	4	0.534
17	GFLDIVKEVGKVALGAVSKLF	8E	0.92	0.8	0.58	2	0.550
18	GFLDIVKQVGKVALGAVSKLF	8Q	0.99	0.96	0.56	3	0.570

19	GFLDIVKSVGKVALGAVSKLF	8S	0.98	0.93	0.65	3	0.579
20	GFLDIVKGVGQVALGAVSKLF	11Q	0.95	0.72	0.53	2	0.618
21	GFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	15K	1	0.98	0.63	4	0.534
22	GFLDIVKGVGKVALAAVSKLF	15A	0.99	0.95	0.61	3	0.596
23	GFLDIVKGVGKVALEAVSKLF	15E	0.92	0.8	0.58	2	0.550
24	GFLDIVKGVGKVALNAVSKLF	15N	0.99	0.97	0.72	3	0.552
25	GFLDIVKGVGKVALSAVSKLF	15S	0.98	0.93	0.65	3	0.579
26	GFLDIVKGVGKVALGAVGKLF	18G	0.98	0.96	0.51	3	0.583
27	GFLDIVKGVGKVALIAVSKLF	18I	0.99	0.97	0.73	3	0.667
28	GFLDIVKGVGKVALLAVSKLF	18L	0.99	0.96	0.56	3	0.662
29	GFLDIVKGVGKVALFAVSKLF	18F	0.96	0.94	0.66	3	0.662
30	GFLDIVKGVGKVALWAVSKLF	18W	0.95	0.86	0.66	3	0.688
31	GFLDIVKGVGKVALPAVSKLF	18P	0.97	0.93	0.66	3	0.615

Anexo 9. Cribado por actividad antibacteriana.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA POLAR							
Cribado por actividad antimicrobiana y antifúngica							
N°	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	5	0.57
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	4	0.589
1	GFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	4K	1	0.99	0.62	4.1	0.624
2	GFLNIVKGVGKVALGAVSKLF	4N	0.99	0.99	0.76	3.9	0.691
3	GFLHIVKGVGKVALGAVSKLF	4H	0.99	0.99	0.64	2.09	0.634
4	GFLCIVKGVGKVALGAVSKLF	4C	0.99	0.99	0.7	4	0.534
6	GFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	8K	1	0.98	0.63	4	0.534
7	GFLDIVKQVGKVALGAVSKLF	8Q	0.99	0.96	0.56	3	0.596
8	GFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	15K	1	0.98	0.63	3	0.552
9	GFLDIVKGVGKVALAAVSKLF	15A	0.99	0.95	0.61	3	0.667
10	GFLDIVKGVGKVALNAVSKLF	15N	0.99	0.97	0.72	3	0.662
11	GFLDIVKGVGKVALIAVSKLF	18I	0.99	0.97	0.73	5	0.57
12	GFLDIVKGVGKVALLAVSKLF	18L	0.99	0.96	0.56	4	0.589
13	GFLDIVHGVGKVALGAVSKLF	7H	0.98	0.96	0.59	2	0.634

Anexo 10. Cribado por efecto hemolítico.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA POLAR						
Cribado por efecto hemolítico						
N°	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	HÉLICE
1	GFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	4K	1	0.99	0.62	HÉLICE
2	GFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	8K	1	0.98	0.63	HÉLICE
3	GFLDIVKQVGKVALGAVSKLF	8Q	0.99	0.96	0.56	RANDOM
4	GFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	15K	1	0.98	0.63	HÉLICE

5	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	18L	0.99	0.96	0.56	RANDOM
6	GFLDIVHGVGKVALGAVSKLF	7H	0.98	0.96	0.59	HÉLICE

Anexo 11. Cribado por estructura.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA POLAR						
Cribado por estructura						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	HÉLICE
1	GFLKIVKGVGKVALGAVSKLF	4K	1	0.99	0.62	HÉLICE
2	GFLDIVKKVGKVALGAVSKLF	8K	1	0.98	0.63	HÉLICE
3	GFLDIVKGVGKVALKAVSKLF	15K	1	0.98	0.63	HÉLICE
4	GFLDIVHGVGKVALGAVSKLF	7H	0.98	0.96	0.59	HÉLICE

Cara no polar

Anexo 12. Análogos generados sustituyendo aminoácidos por otros comunes en PAMs.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA NO POLAR							
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523
1	GLLDIVKGVGKVALGAVSKLF	2L	0.99	0.96	0.52	3	0.577
2	GFWDIVKGVGKVALGAVSKLF	3W	0.94	0.85	0.6	3	0.607
3	GFLDILKGVGKVALGAVSKLF	6L	0.99	0.98	0.68	3	0.604
4	GFLDIKGVGKVALGAVSKLF	6I	1	0.99	0.8	3	0.609
5	GFLDINKGVGKVALGAVSKLF	6N	1	0.99	0.79	3	0.494
6	GFLDKVKGKVALGAVSKLF	5K	0.99	0.97	0.5	4	0.448
7	GFLDEVKGVGKVALGAVSKLF	5E	0.84	0.69	0.5	2	0.465
8	GFLDSVKGVGKVALGAVSKLF	5S	0.95	0.88	0.54	3	0.493
9	GFLDPVKGVGKVALGAVSKLF	5P	0.94	0.86	0.56	3	0.530
10	GFLDIVKGKGKVALGAVSKLF	9K	1	0.99	0.66	4	0.476
11	GFLDIVKGQGKVALGAVSKLF	9Q	1	0.95	0.6	3	0.512
12	GFLDIVKGAGKVALGAVSKLF	9A	0.99	0.97	0.67	3	0.538
13	GFLDIVKGVAKVALGAVSKLF	10A	0.99	0.95	0.61	3	0.596
14	GFLDIVKGVLKVALGAVSKLF	10L	0.99	0.96	0.56	3	0.662
15	GFLDIVKGVIKVALGAVSKLF	10I	0.99	0.97	0.73	3	0.667
16	GFLDIVKGVFKVALGAVSKLF	10F	0.96	0.94	0.66	3	0.666
17	GFLDIVKGVTKVALGAVSKLF	10T	0.95	0.92	0.6	3	0.593
18	GFLDIVKGVPKVALGAVSKLF	10P	0.97	0.93	0.7	3	0.615
19	GFLDIVKGVGKEALGAVSKLF	12E	0.96	0.88	0.67	2	0.492
20	GFLDIVKGVGKSALGAVSKLF	12S	0.99	0.96	0.76	3	0.521
21	GFLDIVKGVGKQALGAVSKLF	12Q	1	0.95	0.6	3	0.512
22	GFLDIVKGVGKKALGAVSKLF	12K	1	0.99	0.66	4	0.476

23	GFLDIVKGVGKNALGAVSKLF	12N	1	0.99	0.79	3	0.494
24	GFLDIVKGVGKPALGAVSKLF	12P	0.99	0.95	0.76	3	0.557
25	GFLDIVKGVGKVPLGAVSKLF	13P	0.96	0.93	0.7	3	0.600
26	GFLDIVKGVGKVAGGAVSKLF	14G	0.97	0.93	0.54	3	0.500
27	GFLDIVKGVGKVAPGAVSKLF	14P	0.96	0.9	0.64	3	0.534
28	GFLDIVKGVGKVALGHVSKLF	16H	0.99	0.98	0.64	3	0.572
29	GFLDIVKGVGKVALGEVSKLF	16E	0.9	0.81	0.63	2	0.536
30	GFLDIVKGVGKVALGGVSKLF	16G	0.98	0.95	0.63	3	0.566
31	GFLDIVKGVGKVALGKVSKLF	16K	0.99	0.98	0.63	4	0.519
32	GFLDIVKGVGKVALGAVSYLF	19Y	0.78	0.68	0.61	2	0.674

Anexo 13. Cribado por actividad antibacteriana.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA NO POLAR							
Cribado por actividad antimicrobiana y antifúngica							
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.523
1	GLLDIVKGVGKVALGAVSKLF	2L	0.99	0.96	0.52	3	0.577
2	GFLDILKGVGKVALGAVSKLF	6L	0.99	0.98	0.68	3	0.604
3	GFLDIKGVGKVALGAVSKLF	6I	1	0.99	0.8	3	0.609
4	GFLDINKGVGKVALGAVSKLF	6N	1	0.99	0.79	3	0.494
5	GFLDKVKGVGKVALGAVSKLF	5K	0.99	0.97	0.5	4	0.448
6	GFLDIVKKGKVALGAVSKLF	9K	1	0.99	0.66	4	0.476
7	GFLDIVKGQKVALGAVSKLF	9Q	1	0.96	0.6	3	0.512
8	GFLDIVKGAGKVALGAVSKLF	9A	0.99	0.97	0.67	3	0.538
9	GFLDIVKGVAKVALGAVSKLF	10A	0.99	0.96	0.61	3	0.596
10	GFLDIVKGVAKVALGAVSKLF	10A	0.99	0.96	0.61	3	0.662
11	GFLDIVKGVLKVALGAVSKLF	10L	0.99	0.96	0.56	3	0.667
12	GFLDIVKGVIKVALGAVSKLF	10I	0.99	0.97	0.73	3	0.521
13	GFLDIVKGVGKSALGAVSKLF	12S	0.99	0.96	0.76	3	0.512
14	GFLDIVKGVGKQALGAVSKLF	12Q	1	0.96	0.6	4	0.476
15	GFLDIVKGVGKKALGAVSKLF	12K	1	0.99	0.66	3	0.494
16	GFLDIVKGVGKNALGAVSKLF	12N	1	0.99	0.79	3	0.557
17	GFLDIVKGVGKPALGAVSKLF	12P	0.99	0.96	0.76	3	0.572
18	GFLDIVKGVGKVALGHVSKLF	16H	0.99	0.98	0.64	2	0.536
19	GFLDIVKGVGKVALGKVSKLF	16K	0.99	0.98	0.63	3	0.581

Anexo 14. Cribado por efecto hemolítico.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA NO POLAR						
Cribado por efecto hemolítico						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	HÉLICE
1	GLLDIVKGVGKVALGAVSKLF	2L	0.99	0.96	0.52	HÉLICE
2	GFLDKVKGVGKVALGAVSKLF	5K	0.99	0.97	0.5	HÉLICE
3	GFLDIVKGVVKVALGAVSKLF	10L	0.99	0.96	0.56	RAMDOM

Anexo 15. Cribado por estructura.

ESTRATEGIA SUSTITUCIÓN AA PREDOMINANTE EN CARA NO POLAR						
Cribado por estructura						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	EST ^d
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	Original	0.98	0.96	0.6	HÉLICE
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	HÉLICE
1	GLLDIVKGVGKVALGAVSKLF	2L	0.99	0.96	0.52	HELICE
2	GFLDKVKGVGKVALGAVSKLF	5K	0.99	0.97	0.5	HELICE

Combinaciones

Estrategia 1

Anexo 16. Análogos generados de combinaciones estrategia 1.

ESTRATEGIA 1							
Combinaciones							
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	C ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.528
1	GALDIVKGVGKVALGAVKKLF	2A18K	1	0.98	0.45	4	0.465
2	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLA	21A18K	1	0.98	0.45	4	0.465
3	GALKIVKGVGKVALGAVKKLF	2A4K18K	1	0.99	0.45	6	0.455
4	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLA	21A4K18K	1	0.99	0.45	6	0.455
5	GALKIVKGVGKVALKAVKKLF	2A4K15K18K	1	0.99	0.50	7	0.408
6	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLA	21A4K15K18K	1	0.99	0.50	7	0.408
7	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLF	10K18K	1	0.99	0.52	4	0.536
8	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLF	10K4K18K	1	1	0.53	6	0.525
9	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLF	10K4K15K18K	1	0.99	0.64	7	0.478

Anexo 17. Cribado por efecto hemolítico.

ESTRATEGIA 1						
Cribado por efecto hemolítico						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	AP ^e
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	0.870
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	0.922
1	GALDIVKGVGKVALGAVKKLF	2A18K	1	0.98	0.45	0.930
2	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLA	21A18K	1	0.98	0.45	0.908
3	GALKIVKGVGKVALGAVKKLF	2A4K18K	1	0.99	0.45	0.936
4	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLA	21A4K18K	1	0.99	0.45	0.923
5	GALKIVKGVGKVALKAVKKLF	2A4K15K18K	1	0.99	0.50	0.937
6	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLA	21A4K15K18K	1	0.99	0.50	0.925
7	GFLDIVKGVGKVALGAVKKLF	10K18K	1	0.99	0.52	0.906
8	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLF	10K4K18K	1	1	0.53	0.825

^e Probabilidad de ser antiparasitario (AP) generada por PredAPP.

Anexo 18. Cribado por actividad antiparasitaria

ESTRATEGIA 1						
Cribado por actividad antiparasitaria						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	AP ^e
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	0.870
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	0.922
1	GALDIVKGVGKVALGAVKKLF	2A18K	1	0.98	0.45	0.930
2	GALKIVKGVGKVALGAVKKLF	2A4K18K	1	0.99	0.45	0.936
3	GFLKIVKGVGKVALGAVKKLA	21A4K18K	1	0.99	0.45	0.923
4	GFLKIVKGVGKVALKAVKKLA	21A4K15K18K	1	0.99	0.50	0.925
5	GALKIVKGVGKVALKAVKKLF	2A4K15K18K	1	0.99	0.50	0.937

Estrategia 2

Anexo 19. Análogos generados de combinaciones estrategia 2.

ESTRATEGIA 2							
Combinaciones							
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB ^a	AF ^a	HM ^b	CH ^c	HD ^c
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	3	0.581
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	6	0.528
1	GLLKIVKGVGKVALGAVSKLF	2L4K	1	0.99	0.53	3	0.581
2	GLLDIVHGVGKVALGAVSKLF	2L7H	0.98	0.92	0.54	6	0.528
3	GLLDIVKKVGKVALGAVSKLF	2L8K	1	0.99	0.48	5	0.566
4	GLLDIVKGVGKVALKAVSKLF	2L15K	1	0.99	0.48	2.09	0.63
5	GFLKKVKGKVALGAVSKLF	5K4K	1	0.99	0.51	4	0.53
6	GFLDKVHGVGKVALGAVSKLF	5K7H	0.98	0.95	0.47	4	0.53
7	GFLDKVKKVGKVALGAVSKLF	5K8K	1	0.98	0.56	6	0.438
8	GFLDKVKGKVALKAVSKLF	5K15K	1	0.98	0.56	3.09	0.501

Anexo 20. Cribado por actividad antimicrobiana.

ESTRATEGIA 2						
Cribado por actividad antibacteriana y antifúngica						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB^a	AF^a	HM^b	AP^e
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	0.870
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	0.922
1	GLLKIVKGVGKVALGAVSKLF	2L4K	1	0.99	0.53	0.936
2	GLLDIVKKVGKVALGAVSKLF	2L8K	1	0.99	0.48	0.928
3	GLLDIVKGVGKVALKAVSKLF	2L15K	1	0.99	0.48	0.925
4	GFLKKVKGKVALGAVSKLF	5K4K	1	0.99	0.51	0.931
5	GFLDKVKKVGKVALGAVSKLF	5K8K	1	0.98	0.56	0.915
6	GFLDKVKGKVALKAVSKLF	5K15K	1	0.98	0.56	0.912

Anexo 21. Cribado por actividad antiparasitaria.

ESTRATEGIA 2						
Cribado por actividad antiparasitaria						
Nº	SECUENCIA	NOMBRE	AB^a	AF^a	HM^b	AP^e
M	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1	0.98	0.96	0.6	0.870
A	GFLKIVKGVGKVALKAVSKLF	[K4K15]	1	1	0.44	0.922
1	GLLKIVKGVGKVALGAVSKLF	2L4K	1	0.99	0.53	0.936
2	GLLDIVKKVGKVALGAVSKLF	2L8K	1	0.99	0.48	0.928
3	GLLDIVKGVGKVALKAVSKLF	2L15K	1	0.99	0.48	0.925
4	GFLKKVKGKVALGAVSKLF	4K5K	1	0.99	0.51	0.931