



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**



**“Diseño de variantes del péptido antimicrobiano VC15 y su  
interacción con membranas lipídicas”**

## **Tesis**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BIOL. ZURIEL GONZÁLEZ CARRERA**

DIRECTORA:

**DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

CODIRECTOR:

**DR. LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA**

**CUERNAVACA MORELOS, NOVIEMBRE 2023**



**CEIB**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM**

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas (LEFIP) a cargo de la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB-UAEM).

Gracias por la beca de estudios otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT). No. De Apoyo: 807139

“And so, does the destination matter? Or is it the path we take? I declare that no accomplishment has substance nearly as great as the road used to achieve it. We are not creatures of destinations. It is the journey that shape us. Our callused feet, our backs strong from carrying the weight of our travels, our eyes open with the fresh delight of experiences lived.”

-Brandon Sanderson, *The way of kings*

Con mucho amor

A mi madre, que creyó en mí, incluso  
cuando yo no lo hice.

A mi padre, por enseñarme disfrutar de la  
vida y heredarme sus ganas de vivirla.

A mi hermano, compañero de vida.

A Evelyn por el apoyo y amor  
incondicional.

A la ciencia, que me encontró.

**Agradecimientos:** a la **Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal**, por los años que me recibió en su laboratorio, por el apoyo que siempre me dio y los aprendizajes tan valiosos que me llevo.

Al **Dr. Leonardo David Herrera Zuñiga** por sus consejos, mentoría y más importante: su amistad.

A los miembros del comité sinodal: **Dra. Ma. del Rayo Sánchez Carbente**, **Dr. José Augusto Ramírez Trujillo** por sus comentarios y correcciones que me fueron muy útiles en la realización de este trabajo y también para crecer personalmente.

Al posgrado en biotecnología perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología y a la **Dra. Maria del Carmen Gutiérrez Villafuerte** coordinadora de la Maestría en Biotecnología por su amable apoyo en todo momento que pertencí al posgrado.

A mis compañeros de laboratorio: Eli, Josue, Monica, Daniela, Axel, Carlos, Mariana, Joshua, Saraí, Jaque, Isamar, Cris e Ivett que siempre, de alguna manera, hacían el laboratorio un lugar muy agradable.

A mis compañeros de la generación AGO2021 Martin, Dayana y Luisa por su amable compañerismo.

Al **Dr. Carlos Muñoz Garay**, **Dr. Brantd Bertrand**, **Dr. Pablo Adame** y al **Q. Felipe** por recibirme en el laboratorio de Física de Membranas Biológicas en el Instituto de Ciencias Físicas y por apoyarme en la realización de este trabajo, darme consejos y su valiosa amistad. También a Luis y Kena por su agradable compañerismo.

A mis padres por darme todo el apoyo y confianza, sin ustedes no podría haber logrado nada. A mi hermano por empujarme a seguir adelante y alcanzar mis metas. A Evelyn porque hay cosas que las palabras no pueden expresar. A Juan, porque te volviste mi hermano a través de los años.

# I. ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Clasificación de los antibióticos .....	3
2.2 Principales factores que contribuyen a la resistencia a antibióticos .....	4
2.2.1 Impacto de las prácticas agrícolas .....	4
2.3 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos .....	9
2.3.1 Modificación del antibiótico .....	9
2.3.2 Modificación del sitio de unión .....	10
2.3.3 Mecanismos para el eflujo del fármaco .....	10
2.4 Terapias alternativas para abordar la resistencia bacteriana .....	11
2.5 Péptidos antimicrobianos .....	12
2.6 Características fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos .....	13
2.7 Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos .....	14
2.8 Diseño de péptidos antimicrobianos cortos y su potencial terapéutico .....	16
2.8.1 Ingeniería de proteínas en el diseño racional de péptidos antimicrobianos .....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
5.1 Objetivos específicos .....	23
<b>6. METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	24
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	25
7.1 Generación de variantes .....	25
7.1.1 Generación de variantes a través de aminoácidos conservados .....	26
7.2 Análisis de componentes principales .....	28
7.3 Estudio de interacción mediante los servidores “FMAP2.0” y “PPM3.0” .....	28
7.5 Estudios de dinámica molecular .....	29
7.5 Caracterización bioinformática de los péptidos seleccionados .....	31
7.5.1 Caracterización mediante servidores .....	31
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	33
8.1 Variantes generadas a partir de la modificación de la proyección helicoidal .....	33
8.2 Variantes obtenidas a partir de la búsqueda de aminoácidos conservados .....	33
8.2.1 Análisis de componentes principales .....	36
8.3 Estudio de interacción péptido-membrana mediante el servidor FMAP 2.0 .....	36

8.4 Caracterización biológica de las variantes mediante servidores .....	40
8.4.1 Caracterización estructural de variantes .....	42
8.4.2 Orientación estructural péptido-membrana mediante el servidor PPM 3.0. ....	44
8.5 Estudios de dinámica molecular: trayectoria de variantes .....	46
8.5.2 Análisis de grosor y lípido por área .....	51
8.6 Evaluación de actividad antimicrobiana y hemolítica .....	58
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>83</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de antibióticos con base en su mecanismo de acción	4
Figura 2	Clasificación de péptidos antimicrobianos con base en su estructura secundaria.	13
Figura 3	Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos.	15
Figura 4	Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos reportados.	16
Figura 5	Estrategias para el diseño computacional de PAMs.	17
Figura 6	Variantes obtenidas modificando la proyección helicoidal del péptido VC15.	26
Figura 7	Alineamiento de la secuencia de VC15 y las secuencias consenso obtenidas de los alineamientos realizados.	27
Figura 8	Características fisicoquímicas presentes en los péptidos.	31
Figura 9	Análisis de componentes principales.	36
Figura 10	Grafica de barras representando las variantes escogidas debido a su mayor profundidad de penetración y energía de unión	40
Figura 11	Estructuras 3D y predicción de estructura secundaria de variantes.	43
Figura 12	Graficas de trayectorias del centro de masa de los péptidos y la membrana lipídica.	46
Figura 13	Primeras interacciones de los péptidos en el estudio de dinámica molecular.	47
Figura 14	Estructura que representa el tiempo final de simulación de las variantes VC15FL y VC15HK.	48
Figura 15	Estructura que representa el tiempo final de simulación de las variantes VC15H y VC15RH.	49
Figura 16	Representación del movimiento y desplazamiento de lípidos causado por una "horquilla" a partir de aminoácido G10 en la estructura de VC15RH.	50
Figura 17	Media del grosor de la membrana en los sistemas analizados	52
Figura 18	Análisis de grosor localizado.	53

Figura 19	Curvatura negativa generada en el sistema VC15FL que favoreció la interacción del péptido colocado lateralmente a la membrana.	54
Figura 20	Análisis de densidad en el sistema VC15RH.	55
Figura 21	Media del APL de la membrana en los sistemas analizados.	56
Figura 22	Análisis de APL localizado.	57

### III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales actividades agrícolas y el uso de diferentes antibióticos.	5
Tabla 2	Terapias alternativas para combatir la resistencia antibacteriana.	12
Tabla 3	Características y modelo 3D de Pin2 y sus variantes cortas VC11/LPin2 y VC15/L Pin2.	21
Tabla 4	Características de los sistemas que fueron diseñados para el estudio de dinámica molecular.	30
Tabla 5	Variantes obtenidas mediante la modificación de la proyección helicoidal del péptido VC15 y sus características fisicoquímicas.	34
Tabla 6	Variantes propuestas mediante cambios puntuales utilizando aminoácidos conservados.	35
Tabla 7	Resultados obtenidos a partir del estudio péptido-membrana con las variantes 37 propuestas.	38
Tabla 8	Caracterización de las variantes generadas.	41
Tabla 9	C-scores obtenidos en los modelos para cada variante mediante el servidor I-TASSER.	42
Tabla 10	Valores de sOPEP y tm obtenidos en cada modelo para las 4 variantes.	43
Tabla 11	Análisis de orientación estructural péptido-membrana.	50
Tabla 12	Comparación de resultados obtenidos mediante PPM3.0 con péptidos antimicrobianos que han sido caracterizados experimentalmente.	44

#### IV. ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
APD	Antimicrobial Peptide database
DBAASP	Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides
DRAMP	Data Repository of Antimicrobial Peptides
PAMS	Péptidos antimicrobianos
ATCC	American Type Culture Colection
MDR	Multidrug resistance
OMS	Organización Mundial de la Salud
DDD	Defined Daily Dose
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Asp / D	Asparagina
Ser / S	Serina
ABC	ATP-binding-cassette
MFS	Superfamilia de transprtadores facilitadores
Arg / R	Arginina
Lys / K	Lisina
Phe / F	Fenilalanina
Leu / L	Leucina
Gly / G	Glicina
Fs	Femtosegundos
TM	Transmembranal
LOMETS	Local Meta-Threading Server
PDB	Protein Data Bank

## V. RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema de gran impacto que ha reducido significativamente la eficacia de los antibióticos convencionales. Debido a esta situación, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) hicieron un llamado para fomentar la búsqueda de nuevas moléculas antibióticas dirigidas específicamente al grupo de patógenos Gram- debido a que especies como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y especies de *Enterobacter* han aumentado sus índices de resistencia en los últimos años (De Oliveira *et al.*, 2020). Ante este desafío, se han propuesto nuevas alternativas para combatir esta problemática. Uno de estos enfoques es el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs), que son un grupo de moléculas bioactivas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos bacterianos y que se han estudiado ampliamente debido a su potencial aplicación terapéutica ya que existe un particular interés en su baja propensión de generar resistencia y actividad de amplio espectro.

VC15 (FWGALAKGALKLIPS) es un péptido antimicrobiano que se identificó como resultado de la degradación proteolítica del péptido Pin2 (Carmona *et al.*, 2013; González *et al.*, 2021). Presenta un espectro de acción reducido contra las bacterias Gram -, pero sigue siendo activo contra las bacterias Gram +. Es importante destacar que su actividad hemolítica es 10 veces menor que la de Pin2, con una reducción del 50 % al 5%.

En este estudio, se diseñaron variantes de VC15 en vista de aumentar su actividad contra las bacterias Gram -. Un total de 38 variantes fueron diseñadas, de las cuales se seleccionaron cuatro (VC15RH, VC15FL, VC15H y VC15HK) basándose en sus favorables características de energía de unión y penetración en estudios computacionales empleando modelos de membrana implícita de bacterias Gram -. Además, al evaluar cambios en las propiedades físicas mediante simulaciones de dinámica molecular, se observó que las variantes VC15RH y VC15FL presentaron una reducción del grosor de la membrana y del área lipídica del 50 % y 70 %, lo que sugiere que estas variantes podrían ser más efectivas en dañar las membranas de patógenos Gram-.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, la resistencia de bacterias a fármacos antimicrobianos ha captado un gran interés y ha suscitado mucha preocupación, no solo en el ámbito científico, sino también en los aspectos económicos, sociales, de salud y alimenticios. Se estima que para el año 2050, las consecuencias mortales derivadas de este fenómeno podrían alcanzar la cifra de 10 millones de muertes anuales, generando al mismo tiempo pérdidas económicas a nivel global que rondaría los 100 mil millones de dólares (Gelband *et al.*, 2015; O'neil *et al.*, 2016). En Europa, se asocian aproximadamente 25 mil muertes al año con este problema. En los Estados Unidos, por su parte, se informan hasta 2 millones de infecciones y 23 mil defunciones anuales debido a la resistencia bacteriana (Marston *et al.*, 2016).

En contraste, en América Latina no se posee un conocimiento certero acerca de la cantidad aproximada de casos anuales; no obstante, se ha registrado un incremento de bacterias multirresistentes a antibióticos (MDR), entre las que se destacan *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con mayor frecuencia (Primo *et al.*, 2012; Kazmierczak *et al.*, 2015; OPS, 2016; González *et al.*, 2020). Sumado a esta problemática, en años recientes se ha llevado a cabo un esfuerzo considerable para desarrollar una variedad de opciones terapéuticas que contribuyan a abordar este problema. Tal es el caso de la utilización de combinaciones sinérgicas de antibióticos (Ahmed *et al.*, 2014; Vázquez & Kumar, 2015), la fagoterapia (Latz *et al.*, 2016; Domingo & Delgado, 2018), la terapia de luz fotodinámica (Mai *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018), las nanopartículas de plata (Beyth *et al.*, 2015; Qayyum *et al.*, 2017) y la terapia con péptidos antimicrobianos (PAMs) (Berglund *et al.*, 2015).

Los PAMS son moléculas altamente conservadas, y forman parte del sistema de defensa de plantas, insectos, arácnidos, anfibios y mamíferos. Aunque los PAMS pueden tener distintos blancos celulares en la bacteria, una familia importante de ellos interactúa con la membrana lipídica de bacterias a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Una vez que el péptido se integra en la membrana este desestabiliza la estructura y la membrana pierde su resistencia y la célula muere. Dado que el blanco de acción es sobre una estructura celular y no una

proteína o biomolécula susceptible, se presupone que la generación de resistencia es con mucho menos probable (Wang *et al.*, 2010; Pfalzgraff *et al.*, 2018). Sin embargo, pese a que los péptidos antimicrobianos han mostrado ser una gran alternativa para el combate de la resistencia antimicrobiana, existen pocos PAMs aprobados para su uso terapéutico y también para su aplicación en fases clínicas (Argueta *et al.*, 2020), debido a diversas características que limitan su potencial terapéutico, como citotoxicidad, actividad hemolítica, poca estabilidad ante proteasas, pérdida de actividad a bajas concentraciones de sal y un alto costo de producción en péptidos que superan los 20 aminoácidos (Mahlpuu *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2016).

Como alternativa, se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos de longitud reducida, no mayores a 15 aminoácidos. Estos péptidos pueden ser diseñados mediante enfoques bioinformáticos o "*in silico*", partiendo de la secuencia de un péptido líder y sometiendo a modificaciones en la secuencia de aminoácidos como; amidaciones, ciclización molecular, introducción de D-aminoácidos y otros aminoácidos no naturales o modificados. El propósito de estas modificaciones es mejorar la actividad frente a distintos microorganismos, lograr una mayor estabilidad en entornos alcalinos y ante proteasas, así como reducir los costos de producción (Vlieghe *et al.*, 2010; Ramesh *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2018).

Además de esto, las herramientas computacionales, como bases de megadatos en servidores y software, han demostrado ser de gran relevancia en el diseño de nuevas moléculas antimicrobianas (Shannon *et al.*, 2003; Rice & Wereszczynski, 2017; Misawa *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

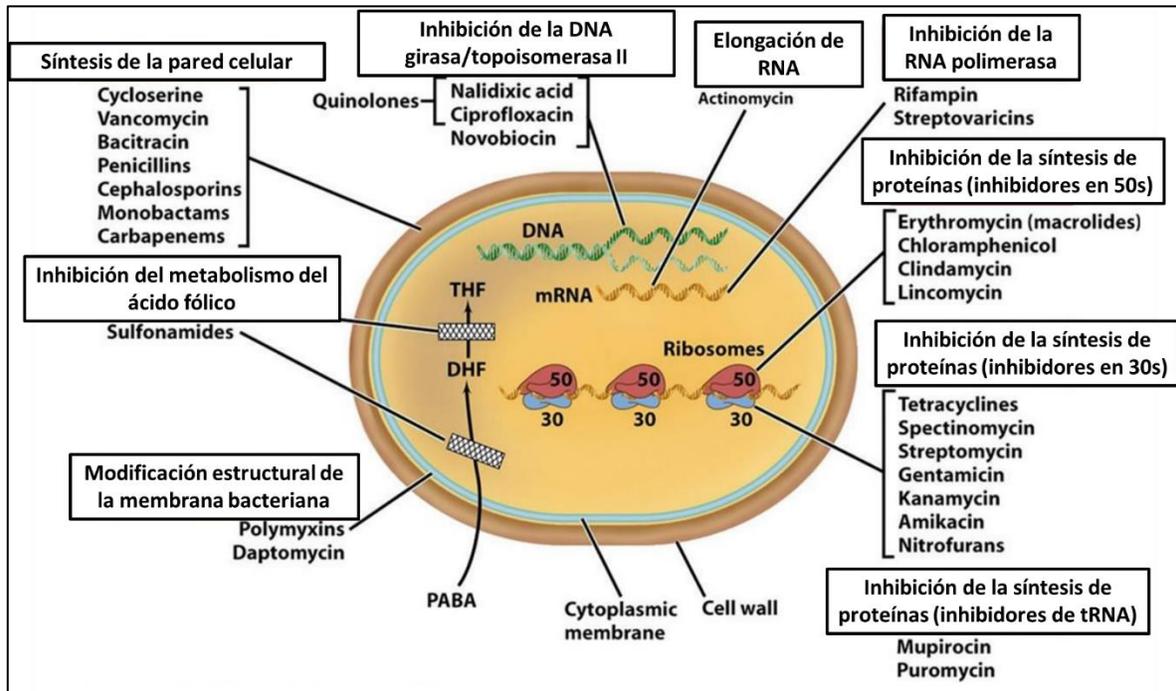
En consecuencia, el diseño de péptidos antimicrobianos cortos es una herramienta valiosa en la búsqueda y desarrollo de alternativas para el control de infecciones causadas por microorganismos, específicamente aquellos que presentan resistencia a múltiples fármacos.

## 2. ANTECEDENTES

El hallazgo de moléculas con propiedades antibióticas marcó un hito significativo en la historia de la humanidad, teniendo un impacto profundo en el aumento de la esperanza de vida que fue notorio en el siglo XX, pasando de 40 a 78 años, principalmente gracias a la producción industrial de la penicilina descubierta por Alexander Fleming en 1929. Este logro inauguró la era de los antibióticos en 1945, complementado por campañas de vacunación y el tratamiento de aguas residuales (Alanis, 2005; Adedeji, 2016). Adicionalmente, entre los años 1950 y 1970, tuvo lugar el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos, período que se conoce como la "época dorada" del hallazgo de estas moléculas. Posteriormente, la ciencia se dedicó a trabajar con estos antibióticos, introduciendo modificaciones para mejorar su espectro de acción y su eficacia (Aminov, 2010).

### 2.1 Clasificación de los antibióticos

A la fecha, se han identificado 19 familias distintas de antibióticos, y su clasificación se basa en su estructura molecular (Van Hoek *et al.*, 2011; Adzitey, 2015). No obstante, también es posible categorizarlos según su espectro de acción, es decir, si afectan el crecimiento de bacterias Gram positivas o Gram negativas, así como otros tipos de bacterias. Además, pueden clasificarse por su mecanismo de acción (Béahdy, 1974; Calderon & Sabundayo, 2007), que abarca la inhibición de la síntesis proteica (como las tetraciclinas y los macrólidos), la inhibición de la síntesis de la pared celular (como las penicilinas y la vancomicina), la interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos (como las quinolonas y la novobiocina), alteraciones en la conformación de la membrana plasmática (como los péptidos antimicrobianos) y la interferencia en la transcripción (como la actinimicina) (Madigan & Martinko, 2006). La Figura 1 presenta una clasificación de los antibióticos basada en su mecanismo de acción.



**Figura 1.** Clasificación de antibióticos con base en su mecanismo de acción (tomado y modificado de Etebu & Arikepar, 2016).

No obstante, el descubrimiento de los antibióticos también conllevó al uso incorrecto de los mismos. Únicamente en el año 2019, se documentó que el 73 % de los antibióticos producidos en el mundo se destinaron al fomento del crecimiento animal en la industria alimentaria (Van Boeckel *et al.*, 2019). En adición a esto, investigaciones de Biju *et al.* en 2020 revelaron que alrededor del 50 % de las recetas de antibióticos emitidas en la atención primaria (en centros de salud, por ejemplo), podrían ser inadecuadas, y se ha observado que el 75 % de tales prescripciones están vinculadas a afecciones comunes como infecciones respiratorias. Por ende, estas prescripciones plantean un riesgo sustancial de ser inapropiadas y desencadenar la aparición de resistencia múltiple en las bacterias (Welschen *et al.*, 2004; Goossens *et al.*, 2005).

## 2.2 Principales factores que contribuyen a la resistencia a antibióticos

### 2.2.1 Impacto de las prácticas agrícolas

La utilización de antibióticos en ámbitos como la acuicultura, la ganadería y la agricultura ha avanzado de manera paralela al desarrollo industrial de estos compuestos. En 1950, Stokstad y Jukes señalaron que el empleo de dosis

subterapéuticas de penicilina y tetraciclina potenciaba el crecimiento de aves de corral en granjas. Esta investigación inicial fue posteriormente respaldada por estudios que corroboraron las conclusiones obtenidas por Stokstad y Jukes. No obstante, persiste la incertidumbre sobre las causas exactas por las cuales los antibióticos propician el aumento de peso y el crecimiento más rápido en animales destinados a la producción de alimentos. Al respecto, se han planteado diversas hipótesis al respecto:

1. Reducción de la población bacteriana: Se especula que los antibióticos podrían disminuir la cantidad total de bacterias presentes en el tracto intestinal, lo que a su vez reduciría la competencia por los nutrientes entre los microorganismos y el huésped.
2. Inhibición de bacterias patógenas: Se sugiere que los antibióticos podrían ejercer una acción inhibitoria sobre las bacterias perjudiciales para la salud.
3. Disminución de la respuesta inmunológica: Existe la teoría de que los antibióticos podrían reducir la actividad del sistema inmunológico.
4. Alteración del metabolismo microbiano: Se plantea que los antibióticos podrían modificar el metabolismo microbiano en el rumen, el primer compartimento del estómago de los animales rumiantes.

Estas explicaciones se derivan de investigaciones como las realizadas por Alexander *et al.* (2008) y Giguère (2013). La Tabla 1 proporciona una vista de la distribución de distintas familias y tipos de antibióticos empleados en diversas prácticas agrícolas y sus aplicaciones correspondientes.

**Tabla 1.** Principales actividades agrícolas y el uso de diferentes

ACTIVIDAD AGRÍCOLA	ANTIBIÓTICOS USADOS	APLICACIONES	REFERENCIA
<b>Avicultura</b>	Amoxicilina, enrofloxacin, doxiciclina, oxitetraciclina, eritromicina, tilosina, aminoglucósidos, sulfonamidas/trimetoprima, colistina, tiamulina	Tratamiento terapéutico en general y promotor de crecimiento	Hofacre <i>et al.</i> , 2013
<b>Acuicultura</b>	Sulfonamidas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas, fenicoles	Evitar infecciones por microorganismos	Heuer <i>et al.</i> , 2009; WHO, 2014
<b>Cultivos agrícolas</b>	Estreptomycin, oxitetraciclina, gentamicina, ácido oxolínico	Evitar infecciones en plantas de producción alimenticia y ornamental	McManus <i>et al.</i> , 2002.

<b>Ganadería</b>	Amoxicilina, penicilina, eritromicina, quinolonas, gentamicina, novobiocina, tilosina, tilmicosina, tetraciclinas	Utilizado para producción de cárnicos, prevención de la neumonía bovina, diarrea, "fiebre del envío" y promotor de crecimiento	McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Alexander <i>et al.</i> , 2008
<b>Producción agrícola de porcinos</b>	Ceftiofur, tetraciclinas, tiamaulina, lincomicina, enrofloxacina, penicilinas, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos	Utilizado para combatir mastitis producidas por <i>Staphylococcus</i> y otras enfermedades. También para promover el crecimiento,	Burch, 2013
<b>Caprinocultura</b>	Amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, amoxicilina/ácido clavulánico, enrofloxacina, eritromicina, lincomicina, oxitetraciclina, sulfonamidas, penicilina G, trimetoprima, tilosina, tilmicosin	No se utilizan para promover el incremento de peso, sin embargo, son utilizados para prevenir enfermedades	Clark, 2013

Una amplia variedad de cepas bacterianas con resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés "*multidrug resistance*") se han identificado, principalmente, en el ámbito agrícola. Un ejemplo de ello es el gen *mcr-1*, que otorga resistencia a la colistina, un antibiótico considerado de último recurso en infecciones provocadas por bacterias MDR. Este gen está alojado en el plásmido MCR-1, lo que le confiere la capacidad de transferirse entre bacterias mediante el mecanismo de transferencia horizontal de genes (Liu *et al.*, 2015). Asimismo, se ha documentado que diversos plásmidos relacionados con la resistencia a quinolonas y macrólidos se han documentado tener origen en ambientes acuáticos, estando directamente vinculados con la acuicultura de peces comerciales (Poire *et al.*, 2012; Aedo *et al.*, 2014).

Resulta evidente que el uso generalizado de antibióticos en actividades agrícolas reviste gran importancia. A pesar de existir regulaciones para su empleo, estas no siempre son seguidas de manera rigurosa.

### 2.2.2 Impacto general y consumo irracional del humano y los antibióticos

El consumo de antibióticos alrededor del mundo ha ido en aumento importante durante la última década, tan solo de 2000 a 2015 se registró un aumento del 65 %, de 21.1 billones a 34 billones DDD (por sus siglas en inglés "Defined Daily Dose": Dosis diaria definida) (Klein *et al.*, 2018). El uso general de los antibióticos se puede

clasificar en: 1) Accesibles (de primer o segunda línea terapéutica), 2) de “cuidado” (utilizados en indicaciones específicas debido a su gran probabilidad de generar resistencia) y 3) de reserva (utilizados como último recurso). De acuerdo con estudios realizados (Roberts & Zembower, 2020), el uso *per capita* de antibióticos accesibles ha aumentado en 26.2 % y los de “cuidado” un 90.9 %, sin embargo, el hecho de este aumento debe de ponerse en interpretación, puesto que esto no necesariamente puede ser debido al mal uso que se ha reportado, sino más bien de los cambios en patrones de resistencia, tal es el caso de la gran prevalencia de infecciones causadas por patógenos productores de betalactamasas de espectro extendido.

De acuerdo con datos de la OMS, hasta el año 2004, dos tercios de los antibióticos a nivel mundial eran adquiridos sin prescripción médica, mayoritariamente en el sector privado de la atención sanitaria. Este sector se reconocía por tener regulaciones menos estrictas en cuanto a la venta y obtención de medicamentos en general (OMS, 2004). En el 2019, Auta *et al.* determinaron que, a nivel global, el 62 % de los antibióticos vendidos en ese año lo fueron sin la debida prescripción médica. Además, señalaron que Sudamérica presentaba el porcentaje más alto de antibióticos vendidos sin receta, con un total de 78 %. Este estudio también identificó que las fluoroquinolonas y las penicilinas eran los grupos de antibióticos más comúnmente adquiridos sin prescripción (Auta *et al.*, 2019).

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la entidad responsable de salvaguardar la salud de la población mediante la regulación de la calidad y los precios de los productos de consumo. Asimismo, lleva a cabo una supervisión inteligente y eficiente en el ámbito de la salud. Sin embargo, no fue sino hasta el año 2010 cuando se publicó el acuerdo que regula la venta y suministro de antibióticos. Gracias a las disposiciones establecidas en este acuerdo, se experimentó una disminución en la venta de antibióticos de aproximadamente un 20 % en tan solo un año, seguido de otro 8 % en el segundo año posterior a su implementación (Arriola - Peñalosa, 2015).

No obstante, en un estudio conducido por Amábile – Cuevas *et al.*, en el año 2020 se comparó el nivel de resistencia bacteriana en México con respecto al año 2010.

Los resultados reflejaron un incremento generalizado en la resistencia. Por ejemplo, en el caso de *E. coli*, se observó un aumento en la resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación de 33 % al 62 %. Además, se reportó que el 80 % de las cepas de diferentes géneros aisladas de muestras de orina presentaban resistencia a ciprofloxacina. El estudio también evidenció un aumento en la resistencia a penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina y co-trimoxazol en cepas de *E. coli* aisladas de hospitales privados. En relación con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, se registró un incremento en la resistencia de entre 10 % y 20 % hacia ciprofloxacina, ceftazidima e imipenem en aislados de hospitales privados. Adicionalmente, se observó un aumento del 74 % en la resistencia de *Acinetobacter* spp y *P. aeruginosa* a levofloxacina, meropenem y tazobactam en aislados provenientes de infecciones nosocomiales. Este estudio también reveló que la presencia del plásmido de resistencia MCR-1 a la colistina fue inicialmente detectada en el 2018 en un aislado proveniente de una explotación porcina. No obstante, hasta la fecha, no se ha determinado la gravedad de la presencia de este plásmido de resistencia. Otro trabajo informó que 13 de 49 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de niños mexicanos con fibrosis quística presentaban resistencia a colistina (Rosales *et al.*, 2020). Cabe mencionar también el aumento marcado en la presencia de genes de resistencia a vancomicina, carbapenem, linezolid, teicoplanina y penicilinas (Barrios *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2015; Curiel *et al.*, 2019).

En un estudio publicado en 2022 por Miranda-Novales *et al.*, se determinó que en hospitales de México clasificados por el número de camas disponibles de entre 100 a 500, el nivel de resistencia en la familia *Enterobacteriaceae* fue el más alto, particularmente *E. coli* fue el aislado resistente más recurrente, presentando resistencia a tercera y cuarta generación de cefalosporinas, ciprofloxacina y tazobactam dejando únicamente a los antibióticos carbapenémicos como único tratamiento para bacteriemias ocasionadas por este patógeno. Es relevante mencionar, que la mayoría de patógenos Gram - reportados fueron resistentes a ampicilina y combinaciones entre ampicilina y sulbactam. Lo cual indica que los

antibióticos de primer uso están quedando inutilizables en infecciones causadas por estos microorganismos (Miranda-Novales *et al.*, 2022)

### **2.3 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos**

La resistencia a antibacterianos surge cuando los antibióticos no logran ejercer sus efectos a concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), y esto se debe a que las bacterias desarrollan distintos mecanismos de resistencia, que pueden ser de origen adaptativo, adquirido o intrínseco (Joon - Hee, 2019). La resistencia intrínseca se refiere a aquella que se deriva de las propiedades estructurales de la célula bacteriana, que impiden la interacción entre el antibiótico y su receptor (Christaki *et al.*, 2019). En lo que concierne a la resistencia adquirida, esta ocurre cuando una bacteria es expuesta a dosis bajas del antibiótico y es capaz de generar mecanismos de resistencia mediante mutaciones o adquisición de material genético externo (transferencia horizontal de genes) (Holmes *et al.*, 2016; Munita & Arias, 2016). Finalmente, la resistencia adaptativa se relaciona con señales ambientales específicas (por ejemplo, estrés, pH, estado de crecimiento, concentración de iones, niveles sub-inhibitorios de antibióticos, entre otros). En comparación con la resistencia intrínseca y la adquirida, la resistencia adaptativa es transitoria, ya que desaparece una vez que la señal ambiental se ha desvanecido (Fernández *et al.*, 2011; Salimiyan *et al.*, 2018).

La resistencia bacteriana a antibióticos es producto de diversos mecanismos, que pueden implicar la destrucción o modificación del antibiótico, la alteración del sitio de acción o la interacción con el antibiótico, cambios en la permeabilidad de la membrana que impiden la entrada de los antibióticos a la célula y también la intervención de bombas de eflujo. Estas últimas son transportadores transmembranales que se encargan de expulsar moléculas antibióticas hacia el espacio extracelular, como un mecanismo de desintoxicación (Christaki *et al.*, 2019).

#### **2.3.1 Modificación del antibiótico**

Este mecanismo de acción es dirigido por enzimas producidas por la célula bacteriana. Puede manifestarse a través de la degradación completa del antibiótico o mediante la transferencia de un grupo químico al mismo. Uno de los ejemplos más

estudiados de este tipo de mecanismo es el de las  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico presente en antibióticos como las penicilinas y las cefalosporinas, entre otros (Christensen *et al.*, 1990; Page, 2012). Otro antibiótico susceptible a la inactivación por hidrólisis es la tetraciclina, a través del gen *tetX* (Kumar *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015). Además de esto, también existen fosforilasas y acetilasas que desactivan los aminoglucósidos (Nambi & Basu, 2010), el cloranfenicol y las fluoroquinolonas (Schwarz *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Modificación del sitio de unión

La especificidad de los antibióticos, si bien es una ventaja, también puede considerarse una desventaja, ya que brinda a las bacterias la capacidad de alterar el sitio de unión de estos compuestos en un período corto. Un ejemplo ilustrativo de este mecanismo se observa en la modificación de los aminoácidos asparagina (Asp) 87 y serina (Ser) 83 en la DNA girasa, así como asparagina (Asp) 84 y serina (Ser) 80 en la topoisomerasa IV. Estos aminoácidos conforman los puntos de unión para las quinolonas, y se ha constatado que pueden ser sustituidos por otros aminoácidos sin carga eléctrica, ocasionando la pérdida de unión del antibiótico (Yoshida *et al.*, 1990). Tal vez el ejemplo más relevante de modificación en el sitio de acción es la alteración del lípido A, la cual confiere resistencia a la colistina. Esta modificación implica la adición del aminoazúcar L-Ara4N al lipopolisacárido, generando un cambio en la carga eléctrica del lípido A de negativa a positiva. Como resultado, la interacción con la colistina se ve impedida debido a la repulsión entre las moléculas (Lee *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Mecanismos para el eflujo del fármaco

En el caso de las bacterias Gram -, se encuentran presentes bombas de eflujo codificadas en el cromosoma. En algunos casos, estas bombas se expresan de manera constitutiva, mientras que en otros pueden activarse en respuesta a distintos estímulos. Estas bombas pueden conferir resistencia intrínseca a compuestos hidrofóbicos, lo que las convierte en mecanismos presentes en bacterias MDR. Por otro lado, en el caso de las bacterias Gram +, la adquisición de resistencia a través de bombas de eflujo está causada por genes codificados en

plásmidos de resistencia. En su mayoría, estas bombas de eflujo son proteínas de membrana pertenecientes a la familia de transportadores ATP-binding-cassette (ABC) y a la superfamilia de transportadores facilitadores (MFS) (Leclercq, 2002).

## 2.4 Terapias alternativas para abordar la resistencia bacteriana

Desde hace al menos 80 años, los antibióticos son un recurso vital para la humanidad, pero a lo largo de estas décadas, las bacterias han encontrado formas de eludir sus efectos. La resistencia aumenta drásticamente cada año y se estima que alrededor de 700,000 pacientes fallecen anualmente a nivel global debido a la resistencia antibacteriana (Ghosh *et al.*, 2019). Lamentablemente, parte del problema radica en que después de la década de los 80, solamente se han registrado dos nuevas clases de antibióticos, lo que evidencia que la generación de nuevos antibióticos no ha avanzado a la par con el aumento de la resistencia a antibióticos. Por lo tanto, resulta crucial seguir explorando nuevas alternativas para enfrentar este desafío (Gross, 2013). En la Tabla 2 se presentan diversas estrategias en desarrollo para combatir la resistencia antibacteriana, junto con sus ventajas y posibles desventajas. Entre las terapias más prometedoras se encuentra el uso de PAMs, que, debido a su baja probabilidad de generar resistencia y su amplio espectro de acción, representan una alternativa terapéutica sumamente valiosa (Giuliani & Nicoletto, 2007; Browne *et al.*, 2020).

**Tabla 2.** Terapias alternativas para combatir la resistencia antibacteriana

<b>ESTRATEGIA</b>	<b>VENTAJAS SOBRE ANTIBIOTICOS COMERCIALES</b>	<b>POSIBLES DESVENTAJAS</b>
<b>Fagoterapia</b>	Farmacéuticos auto replicativos Selectivo contra cepas bacterianas específicas Fácil de trabajar para la ingeniería genética	Inmunogenicidad Farmacocinética Liberación de endotoxinas bacterianas Generación de resistencia
<b>Lisinas</b>	Selectivo contra cepas bacterianas específicas Fácil de trabajar para la ingeniería genética No es propenso a generar resistencia	Producción Falta de conocimiento suficiente

<b>CRISPR/Cas9</b>	Puede ser utilizado para eliminar mecanismos codificados en la información genética bacteriana Selectivo contra cepas bacterianas específicas	Producción en gran escala costosa Toxicidad
<b>Bacteriocinas</b>	Resistente a calor y UV Selectivo contra cepas bacterianas específicas	Producción en gran escala costosa Susceptibles a proteólisis
<b>Probióticos</b>	Disponibilidad alta	Uso limitado a infecciones intestinales
<b>Anticuerpos</b>	Selectivo contra cepas bacterianas específicas No causa daños al microbiota	Producción en gran escala costosa Vida útil corta
<b>Péptidos antimicrobianos</b>	No es propenso a generar resistencia Espectro de acción amplio	Producción en gran escala costosa Susceptible a proteólisis Toxicidad

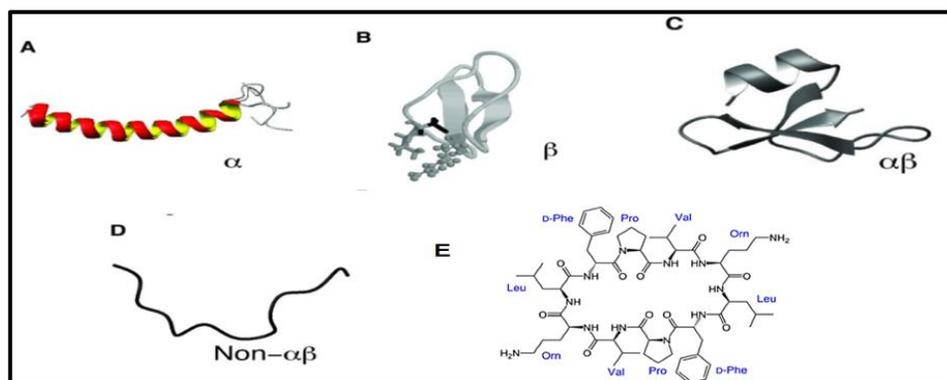
## 2.5 Péptidos antimicrobianos

Los PAMs son proteínas de bajo peso molecular que constan de entre 5 y 60 aminoácidos, y exhiben actividad contra diversos microorganismos, tales como bacterias, levaduras y virus, entre otros. Los PAMs también forman parte del sistema inmunológico de la mayoría de los organismos y se consideran uno de los mecanismos de defensa más antiguos descubiertos hasta la fecha (Brown & Hancock, 2006). El descubrimiento de los PAMs se remonta a 1939, cuando se logró extraer un agente antimicrobiano a partir de una cepa de *Bacillus* hallada en el suelo (Dubos, 1939). Desde entonces, se han aislado PAMs de diversos organismos, siendo notable el hallazgo de más de 300 tipos distintos solo en la piel de las ranas. Según datos de la "*Antimicrobial Peptide Database (APD)*" hasta su última actualización en julio de 2021, se han registrado 3,283 PAMS distribuidos a lo largo de los seis reinos de la vida. Esta distribución es la siguiente: 371 péptidos antibióticos de bacterias, 5 de arqueas, 8 de protistas, 22 de hongos, 361 de plantas y 2431 de animales, incluyendo algunos péptidos sintéticos (Wang *et al.*, 2016; APD, 2021).

### 2.5.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos

La clasificación más ampliamente aceptada de estos péptidos se fundamenta en el tipo de estructura secundaria que presentan, que puede ser  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha\beta$  y no- $\alpha\beta$  (Figura

2). La familia alfa incluye a los PAMs con estructuras helicoidales, y ejemplos representativos de esta familia son los péptidos Magainina-2, LL-37 y Pin2 (Zasloff, 1987; Turner *et al.*, 1998; Corzo *et al.*, 2001). La familia beta está compuesta por PAMS con hojas plegadas en forma de beta, y un ejemplo preeminente de esta familia es la Alfa-defensina humana (Spencer *et al.*, 2012). La familia alfa-beta abarca estructuras que combinan ambas formas tridimensionales (p. ej. Beta defensinas). Por último, la familia no-Alfa-beta agrupa a PAMs que carecen de estas estructuras, y un ejemplo es la indolicidina (Selsted *et al.*, 1992; Wang, 2016).



**Figura 2.** Clasificación de péptidos antimicrobianos con base en su estructura secundaria. A)  $\alpha$ -hélice; B) hoja- $\beta$ ; C) estructura  $\alpha\beta$ ; D) estructura no  $\alpha\beta$ ; E) estructura cíclica (Wang, 2015).

Durante el proceso de plegamiento de una proteína, los aminoácidos que la componen y los enlaces resultantes, como los puentes disulfuro y los puentes de hidrógeno, son factores cruciales en su estructura-función. Lo mismo ocurre en los péptidos, en los que, en términos generales, su secuencia define las características fisicoquímicas que poseerán.

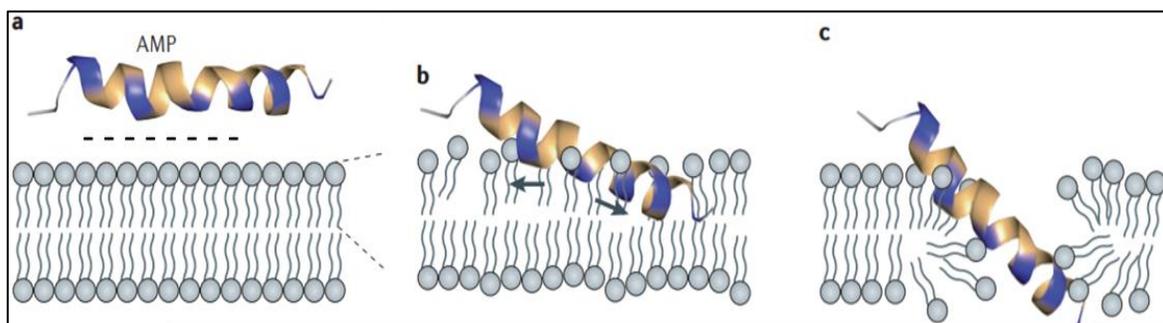
## 2.6 Características fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos

Naturalmente los PAMs son secuencias de no más de 60 aminoácidos, pero la mayoría de estos se encuentran entre los 10 a 30 aminoácidos de longitud. Característicamente presentan cargas positivas de entre +2 a +9 aunque la mayor parte de estos tienen cargas entre +4 y +9, lo que quiere decir que tienen una gran cantidad de aminoácidos cargados como arginina (Arg) lisina (Lys) o histidina (His) (Hancock & Scott, 2000). También presentan características anfipáticas, lo que quiere decir que en una proyección helicoidal se puede observar una cara

hidrofóbica y otra hidrofílica (Pistolesi *et al.*, 2007). La helicidad es de gran importancia en los péptidos antimicrobianos, ya que entre más sea la tendencia a formar este tipo de estructura se verá aumentada la actividad antibacteriana (Huang *et al.*, 2014). Estas características definen la actividad de un péptido antimicrobiano ya que el blanco principal de es en la membrana lipídica por lo cual, las características fisicoquímicas mencionadas le dan la capacidad de internalizar en la membrana (Yeaman & Yount, 2003).

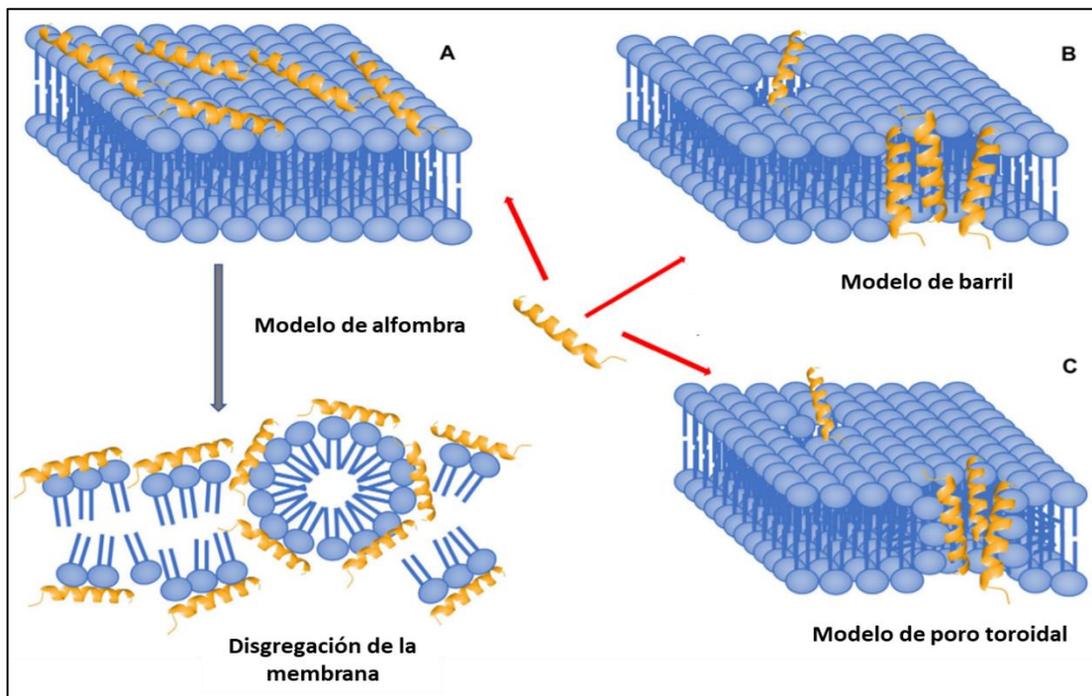
## 2.7 Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos con blanco en membrana celular

El fundamento básico de la acción de los PAMs con blanco en membrana radica en su capacidad de unirse y desestabilizar la membrana bacteriana. Este proceso puede llevarse a cabo a través de diversos modelos de acción que han sido documentados. Sin embargo, el mecanismo general que explica la actividad de estos PAMs se inicia con una primera interacción entre el péptido y los lípidos cargados negativamente presentes en la membrana lipídica bacteriana, como la tetraoleoilcardiolipina (TOCL), la tetramiristoilcardiolipina (TMCL), la fosfatidilserina o la fosfatidiletanolamina. Una vez establecida esta interacción inicial, los aminoácidos hidrofóbicos presentes en los PAMs interactúan con la región interna de la membrana, que también posee propiedades hidrofóbicas, esto resulta en la internalización del péptido (Figura 3). A medida que la concentración de péptidos aumenta, también se incrementan las internalizaciones en la membrana, lo que conduce a la formación de poros y a la degradación de la membrana y, eventualmente, a la lisis celular (Jean-François *et al.*, 2008; Epand & Epand, 2010; Boparai & Sharma, 2020).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos con blanco en membrana celular. A) interacción inicial. B) Internalización. C) Internalización completa del péptido (Tomado y modificado de Fjell *et al.*, 2012).

En particular, se han identificado tres modelos de acción en los PAMs. El primero de ellos es el modelo de "alfombra", en el cual los péptidos se disponen paralelamente a la membrana. A concentraciones elevadas, se produce una desestabilización de la membrana plasmática, lo que resulta en daños estructurales de la membrana que debilitan su resistencia y en la formación de productos más pequeños compuestos por péptidos y lípidos de la membrana. Figura 4, sección A (Shai & Oren, 2001; Correa *et al.*, 2019). Por otro lado, también se conocen los mecanismos de formación de poros tipo "toroidal" y del modelo de "barril sin fondo". En el caso del poro tipo toroidal, los PAMs se posicionan inicialmente de manera lateral en la membrana y luego se internalizan en ella. El poro toroidal se forma debido a estructuras de PAMs que no están ordenadas entre ellas, sino que las cabezas polares de los fosfolípidos interrumpen su ordenamiento, así, el poro toroidal es característicamente desordenado. Figura 4, sección C (Matsuzaki *et al.*, 1995; Omardien *et al.*, 2018). Finalmente, el modelo de barril sin fondo implica que los péptidos se agregan en varias unidades, interaccionando entre ellos mismos y formando un poro de libre tránsito para iones y agua. Por lo tanto, el poro de barril sin fondo se conoce como un poro altamente ordenado. Figura 4, sección B (Lipkin & Lazaridis, 2015).



**Figura 4.** Modelos del mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con blanco en membrana celular. (Tomado y modificado de Huan *et al.*, 2020).

## 2.8 Diseño de péptidos antimicrobianos cortos y su potencial terapéutico

En los últimos años, se ha dado un crecimiento significativo en el diseño de PAMs. La base de datos "*Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides*" (DBAASP), disponible en <https://dbaasp.org/>, ha aumentado tan solo de 2020 a 2023 de 15,000 secuencias reportadas a 17,303. Otro recurso, el "*Data Repository of Antimicrobial Peptides*" (DRAMP), en <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>, presentó en 2019 1440 PAMs sintéticos, de los cuales sólo 80 tienen menos de 20 aminoácidos y a la fecha (noviembre 2023) se encuentran depositadas 1800 secuencias sintéticas. El diseño de péptidos cortos ofrece múltiples ventajas, ya que se puede partir de una secuencia base, que puede provenir de un PAM previamente caracterizado, y realizar modificaciones puntuales, como cambios en aminoácidos específicos o la introducción de grupos químicos como amidas. Además, es posible incorporar aminoácidos no naturales o modificados (Figura 5), pero el aspecto fundamental de diseñar péptidos cortos es reducir los costos de síntesis asociados (Hans *et al.*, 2006).

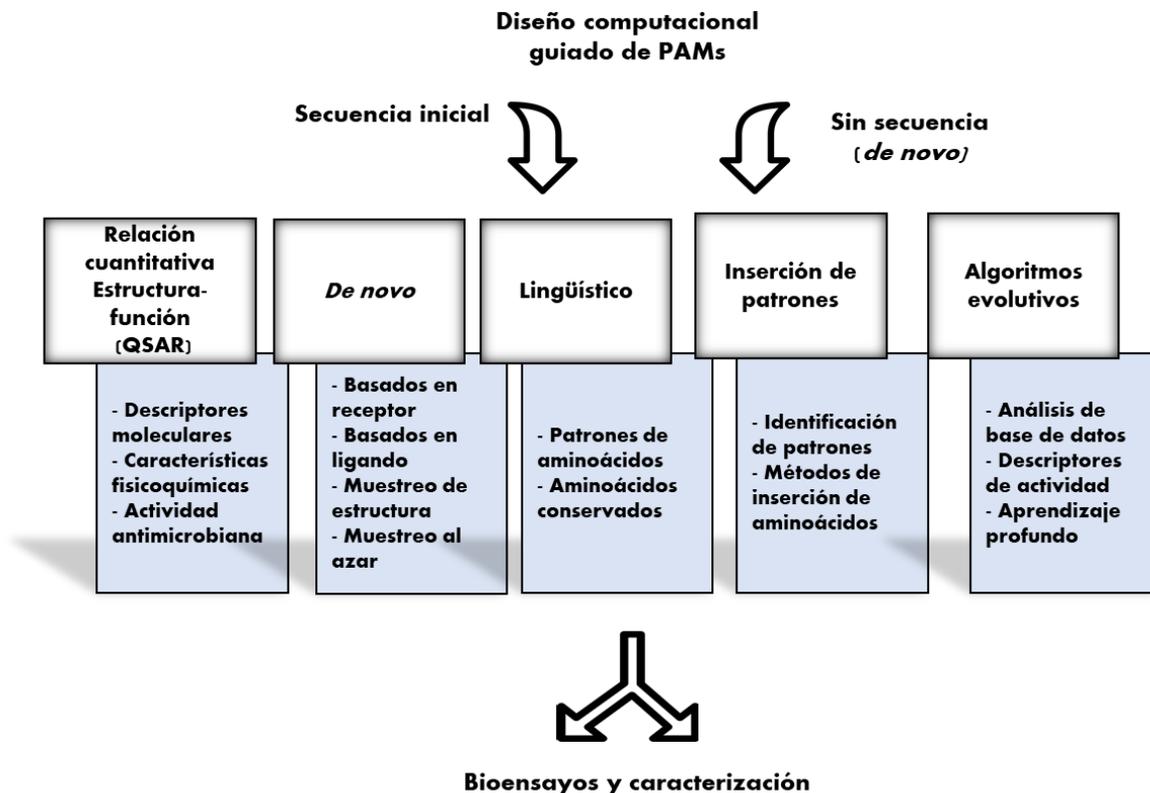


Figura 5. Estrategias para el diseño computacional de PAMs (tomado y modificado de Cardoso *et al.*, 2020).

### 2.8.1 Ingeniería de proteínas aplicada a las herramientas para el diseño racional de péptidos antimicrobianos

La ingeniería de proteínas comprende un conjunto de técnicas aplicadas para la mejora o diseño de estos con funciones específicas (Bornscheuer *et al.*, 2012). Esta estrategia se ha llevado al desarrollo de péptidos antimicrobianos donde el objetivo principal es encontrar secuencias que, al ser alteradas, permitan modificar su actividad y/o estabilidad (Acebes *et al.*, 2016). Para generarlos, se pueden seguir dos enfoques: el diseño racional y la evolución dirigida. Una diferencia significativa entre ambos radica en el costo de producción, ya que el diseño racional requiere conocimiento previo sobre la estructura del péptido con el que se trabaja, mientras que la evolución dirigida comprende ensayos de prueba y error, lo cual puede aumentar los costos de producción y el tiempo de generación de un péptido deseado (Tiwari *et al.*, 2012). Junto con el diseño de péptidos, las herramientas computacionales se han vuelto indispensables para los investigadores. El uso de estas herramientas ha dado paso al diseño "*in silico*", que surge de la necesidad de generar moléculas con una aproximación precisa a la actividad deseada sin requerir grandes recursos (Tiwari *et al.*, 2012). Estas herramientas permiten un nivel atómico de precisión en el diseño de proteínas y se basan en modelos matemáticos que simulan las distintas fuerzas físicas y químicas que actúan en el entorno natural de las proteínas (Poluri & Gulati, 2017). La Dinámica Molecular es una herramienta útil para el diseño de nuevos PAMs. Se trata de un cálculo basado en la mecánica molecular que simula movimientos de partículas, átomos o moléculas en sistemas biológicos. Esta técnica integra las ecuaciones clásicas de movimiento de Newton para todas las partículas del sistema simulado (Gelpi *et al.*, 2015; Childers *et al.*, 2017). Mediante esta técnica, se han diseñado distintos PAMs, como el péptido IL-K7F89, variante del péptido Indolicin que mediante diseño dirigido utilizando dinámica molecular, se logró identificar que al mutar los aminoácidos Pro7, Trp8 y Trp9 por Lys7, Phe8 y Phe9 la actividad antibacteriana se mantuvo frente a *E. coli* con una CMI de 8  $\mu$ M que es no tan alejada a la de Indolicin (2  $\mu$ M) pero notablemente la hemólisis fue reducida del 100 % al 5 % en estas mismas concentraciones (Tsai *et al.*, 2009). También se han desarrollado péptidos con alta

estabilidad a la degradación proteolítica, ambientes de pH ácido y condiciones de alta salinidad, esto en vista de poder mantener su actividad en los diferentes ambientes de posible aplicación como terapéuticos, agrícolas y alimenticios. Por ejemplo, Vishweshwaraiah *et al.*, (2021) diseñaron los péptidos HSEP3-TC y HSEP3D que, mediante sustituciones puntuales, mantuvieron actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus* incluso en condiciones extremas de pH, lo cual los hace péptidos con potencial para su aplicación como conservadores de alimentos.

En años recientes, una tendencia en el diseño de PAMs ha sido utilizar secuencias de PAMs conocidos. Por ejemplo, el péptido LL-37 muestra actividad antibacteriana, pero consta de 35 aminoácidos. Wang *et al.*, (2014) diseñaron los péptidos cortos de 17F2, 17BIPHE2, 17Naph-mF que son basados en la secuencia de LL-37, y contienen cambios puntuales que impactan directamente en las cavidades hidrofóbicas que se visualizaron mediante la estructura tridimensional y que, a su vez, estos cambios demostraron ser efectivos tanto contra bacterias como *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, y *P. aureginosa* y también ser estables frente a proteasas bacterianas. Las secuencias base para el desarrollo de nuevos PAMS cortos pueden provenir de diversas fuentes, como se mencionó anteriormente, ya que los PAMs se distribuyen en diversos organismos (Hancock & Scott, 2000). Solo en animales, según APD, se registran 2431 péptidos provenientes de animales, siendo los artrópodos, como los escorpiones lo más presentes con 91 secuencias registradas, lo cual los hace una fuente significativa de PAMs (Wang & Wang, 2016; APD, 2021).

## 2.9 Péptidos Pandinin 1 y Pandinin 2

En el año 2001, se identificaron dos péptidos en el veneno del alacrán africano *Pandinus imperator*, denominados Pandinin 1 (Pin1) y Pandinin 2 (Pin2). Estos péptidos poseen actividad antimicrobiana y se evaluaron contra diversas bacterias Gram+ como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, así como contra las bacterias Gram- *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, además de la levadura *Candida albicans*. Se

determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ambos péptidos para las distintas cepas bacterianas. En las bacterias Gram+, las CMI variaron entre 2.4 y 4.8 micromolares ( $\mu\text{M}$ ), mientras que en las cepas Gram- oscilaron entre 19.1 y 38.2  $\mu\text{M}$ . Para *C. albicans*, la CMI fue de 19.1  $\mu\text{M}$ . Aunque ambos péptidos mostraron actividad contra estas cepas, su eficacia fue menor en las bacterias Gram- (Corzo *et al.*, 2001). Pin2, en particular, resulta de mayor interés debido a sus características helicoidales y actividad de amplio espectro. Este péptido consta de 24 aminoácidos y presenta una estructura de doble hélice que se origina por la presencia de una prolina en la posición 14 del péptido (Tabla 3). Sin embargo, se observó una notable actividad hemolítica en experimentos *in vitro* de alrededor del 55 % (mayor en Pin2), así como una elevada susceptibilidad a la degradación proteolítica, lo que limita su uso terapéutico (Corzo *et al.*, 2001). El residuo de prolina en la región central de ambos péptidos está vinculado con su actividad hemolítica, ya que otros péptidos como la Melitina y la Pardaxina también presentan este residuo central de prolina. Por otro lado, en el caso de la Magainina, un péptido similar a Pin1 y Pin2 con estructura alfa-hélice aislado de la piel de la rana *Xenopus laevis*, esta prolina central no existe, siendo reemplazada por una glicina en su región central, ausencia que se relaciona con una menor actividad hemolítica. Esto sugiere que la alteración de estos residuos centrales podría influir en la regulación de su actividad hemolítica (Rodríguez, 2012). Lo mismo ocurre con los péptidos Oxipinins 1 y 2 de la araña *Oxyopes kitabensis*, que carecen de prolina en su posición central y presentan valores de hemolisis no mayores al 20% en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y CMIs de 6.2  $\mu\text{M}$  para ambos péptidos (Corzo *et al.*, 2002). Para mitigar los efectos hemolíticos de Pin2, se ideó una alternativa: diseñar variantes de Pin2 mediante la modificación del residuo de prolina 14 con una combinación de aminoácidos estructuralmente más flexibles, con el fin de reducir su actividad hemolítica. Se sintetizaron varias variantes de Pin2, en las cuales el P14 fue sustituido por aminoácidos G, V, GV, VG, GPG, GVG y GPV, basándose en las secuencias de Oxipininas 1 y 2.

Estas variantes dieron lugar a cambios en las propiedades fisicoquímicas del péptido parental Pin2, los cuales se manifestaron únicamente en su actividad

hemolítica. Todas las variantes mostraron una CMI de 12.5  $\mu\text{M}$  contra la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, igual a la reportada previamente para el péptido Pin2. La actividad hemolítica se redujo en la mayoría de las variantes, siendo Pin2GPG la menos hemolítica con una disminución del 70 % en comparación con Pin2. La única variante que mantuvo una alta actividad hemolítica, incluso por encima a la de Pin2, fue la variante Pin2G (Rodríguez, 2012). Una alternativa que se empleó para abordar el problema de la estabilidad proteolítica de Pin2 fue la síntesis del diastereoisómero de Pin2, denominado péptido D-Pin2, mediante síntesis química. Este péptido presentó una alta estabilidad ante enzimas proteolíticas, ya que únicamente el 43 % fue degradado por la tripsina bovina ni la elastasa humana durante un periodo de 24 horas, a diferencia de L-Pin2, que se degradó hasta en un 67 %. Sin embargo, al añadir ambos péptidos al sobrenadante de *P. aeruginosa*, una bacteria que secreta enzimas proteolíticas, se generaron dos fragmentos de 11 y 15 aminoácidos. En cuanto a su actividad antimicrobiana, D-Pin2 demostró una CMI de 12.5  $\mu\text{M}$  contra *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) y dos cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) en ensayos de difusión en agar. Se observó que D-Pin2 no solo presentaba una reducción en su actividad hemolítica del 20 % al 15 %, sino que también mostraba mayor estabilidad frente a proteasas (Carmona *et al.*, 2013). Como se mencionó, se ha reportado la generación de péptidos cortos a partir de la degradación proteolítica de Pin2, dando origen a los péptidos VC11/L-Pin2 y VC15/L-Pin2, cuyas secuencias y características se detallan en la tabla 3 (Carmona *et al.*, 2013).

El péptido VC15 conservó la actividad antibacteriana del parental Pin2, con una CMI de 6.25  $\mu\text{M}$  frente a *S. agalactiae* inhibiendo por completo el crecimiento de este, mientras que frente a *E. coli* se observó una inhibición del crecimiento de hasta 12 horas con la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Cabe resaltar que las pruebas de hemólisis realizadas con este péptido únicamente se observaron hasta un 5 % de hemólisis (González *et al.*, 2020).

**Tabla 3:** Características de los péptidos Pin2 y la variante corta VC15

	<b>Carga neta</b>	<b>Hidrofobicidad (%)</b>	<b>CMI Gram + (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>CMI Gram- (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Hemolisis (%)</b>	<b>GRAVY</b>	<b>Boman (kcal/mol)</b>
<b>Pin2</b>	+3	50	2.4 - 4.8	19.1 - 38.2	55	0.329	0.05
<b>VC15</b>	+2	60	6.24	>50	5	0.81	-1.18
<b>Ascafina-8</b>	+4	57	3	6	5	0.73	-0.39

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Frente al aumento alarmante de los índices de resistencia antimicrobiana en todo el mundo y la falta de avances significativos en la creación y aceptación de nuevas moléculas antimicrobianas, se hace más imperativo proponer soluciones innovadoras que generen alternativas sólidas para contrarrestar este fenómeno. La prevalencia de microorganismos multirresistentes ha acentuado la necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas que permitan enfrentar infecciones que resisten los tratamientos convencionales. En la búsqueda por abordar esta problemática, nuestro grupo de investigación ha dedicado esfuerzos en la evaluación de la eficacia de variantes de PAMs. Una de estas variantes de interés es el péptido VC15, caracterizado por su corta secuencia y su actividad demostrada frente a cepas bacterianas tanto Gram+ como Gram-. Sin embargo, resulta relevante destacar su eficacia relativamente limitada contra las bacterias Gram-, lo que a su vez restringe el espectro global de acción del péptido. No obstante, se ha logrado una mejora considerable al reducir de manera significativa su actividad hemolítica en comparación con su parental, Pin2. Junto a las investigaciones experimentales, la integración de herramientas de bioinformática ha revelado un potencial inmenso en el campo de la investigación de péptidos antimicrobianos. Estas técnicas computacionales se han demostrado invaluable tanto en el diseño y producción de nuevos agentes antimicrobianos como en la mejora de la funcionalidad de los existentes. El uso de herramientas de bioinformática ofrece un enfoque sistemático para abordar el intrincado panorama de la actividad antimicrobiana, las interacciones moleculares y los determinantes estructurales. En este contexto, proponemos la integración de metodologías de bioinformática para el diseño racional de nuevos PAMs, teniendo como base la secuencia del péptido VC15.

### **4. HIPÓTESIS**

Mediante enfoques bioinformáticos será posible generar variantes del péptido VC15 que tengan una mayor actividad contra bacterias Gram-.

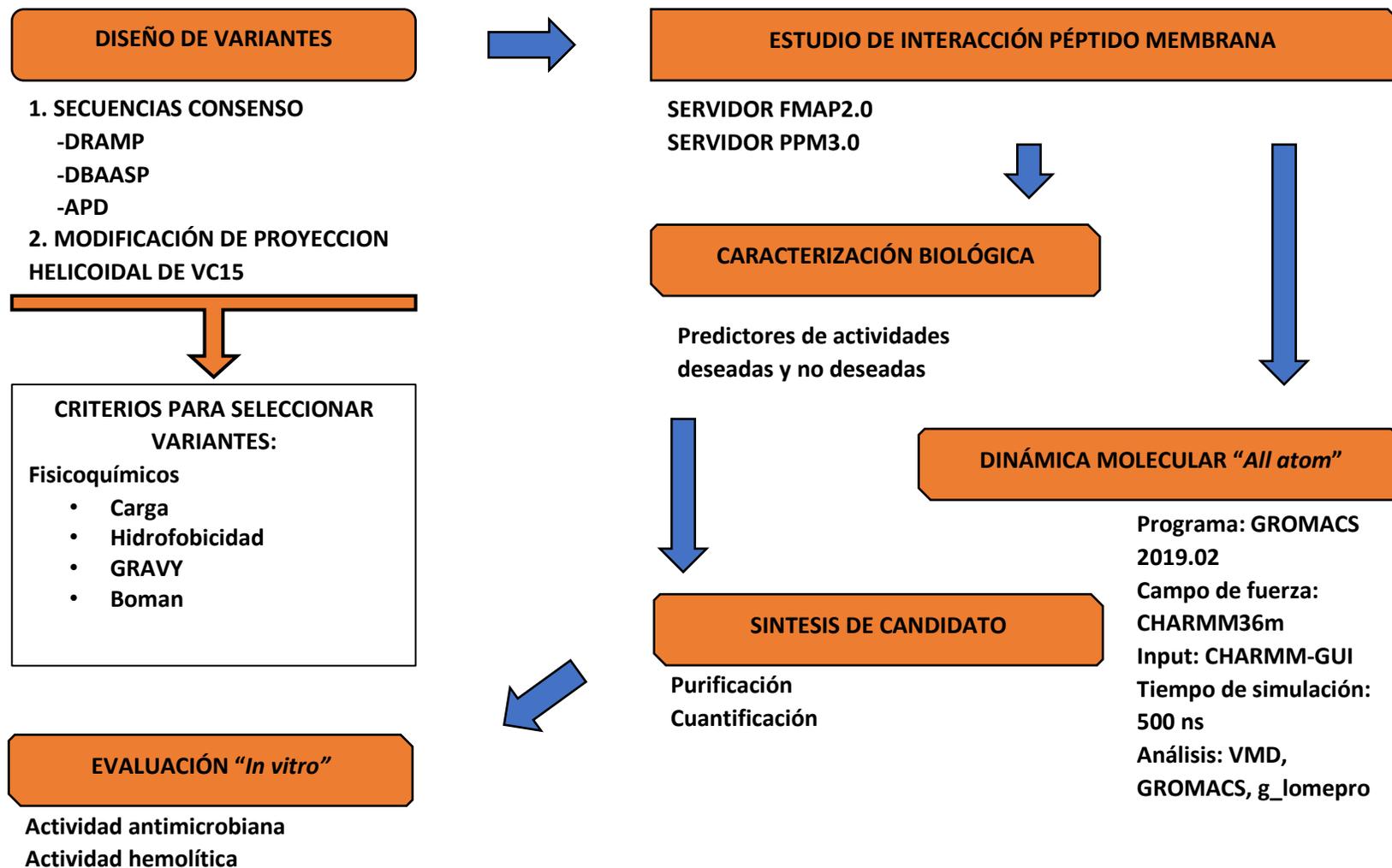
## **5. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar variantes potencialmente más activas del péptido antimicrobiano corto VC15 utilizando técnicas bioinformáticas.

### **5.1 Objetivos específicos**

1. Identificar secuencias conservadas en los PAMs obtenidos de las diferentes bases de datos.
2. Generar variantes utilizando como base la secuencia de VC15.
3. Seleccionar variantes que presentan una mayor energía de interacción y penetración con membranas de tipo Gram- así como las que presenten una mejor calificación en los predictores de los servidores utilizados.
4. Identificar los péptidos que presenten mejor interacción con membranas lipídicas Gram- mediante dinámica molecular.

## 6. METODOLOGÍA GENERAL



## 7. METODOLOGÍA

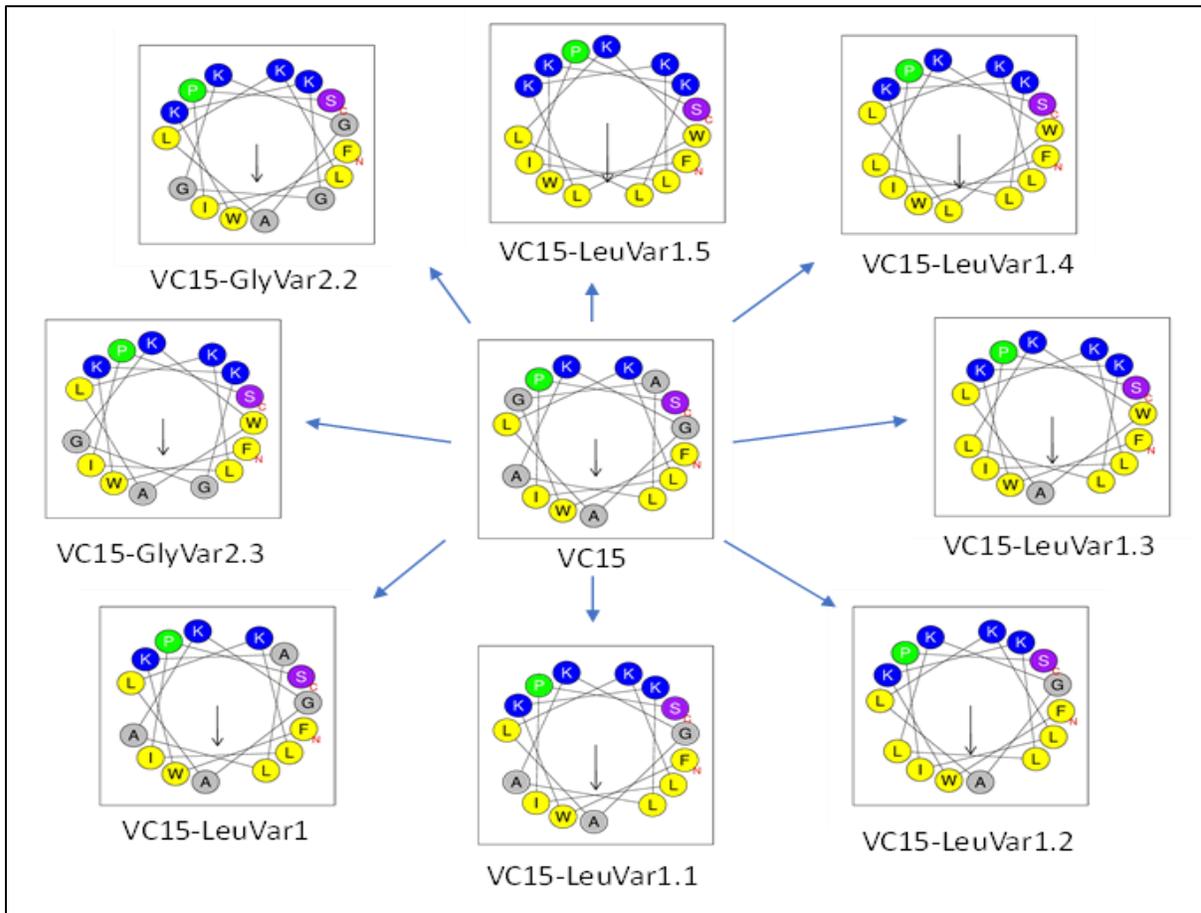
### 7.1 Generación de variantes

Tal como se mencionó previamente, la ingeniería de proteínas y péptidos se puede abordar mediante dos enfoques: evolución dirigida o diseño racional. El primero implica cambios aleatorios en las proteínas, a través de ensayos y errores. En contraste, el diseño racional se basa en el conocimiento de la estructura-función de las proteínas, donde se introducen cambios específicos en secuencias relacionadas con la función de interés. Kim *et al.*, (2014) propusieron criterios para el diseño de péptidos antimicrobianos, que incluyen:

- 1) Estructuras alfa-helicoidales anfipáticas, con residuos hidrofóbicos y polares convergiendo en lados opuestos del eje helicoidal.
- 2) Estrategias para evitar sitios de corte proteolítico mediante residuos hidrofóbicos y polares en sitios profundos, gracias a aminoácidos con cadenas alifáticas largas (Val, Leu, Ile, Gln).
- 3) Hidrofobicidad <50%.
- 4) Carga neta positiva de entre +3 a +7
- 5) Longitud del péptido no mayor a 20 aminoácidos.

Con el objetivo de generar una proyección anfipática, se efectuaron ajustes en la proyección helicoidal del péptido VC15. Partiendo de esta proyección, 6 variantes se generaron utilizando leucina (L) hasta tener una proyección anfipática, donde el aminoácido lisina (K) fue utilizado como aminoácido polar en la cara hidrofílica. Una vez teniendo esta proyección, se generaron 3 variantes utilizando Isoleucina, únicamente cambiando los aminoácidos L previamente añadidos. Este mismo proceso se llevó a cabo con Glicina, y Valina (Figura 6). Estos ajustes se realizaron manteniendo las características fisicoquímicas dentro de los rangos comúnmente reportados en diversos péptidos antimicrobianos, tales como hidrofobicidad, carga neta, índice de Boman, GRAVY, entre otros. Para llevar a cabo estas

modificaciones, se empleó la herramienta "Manual mutation" del servidor HeliQuest (Disponible en: <https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).



**Figura 6.** Variantes obtenidas modificando la proyección helicoidal del péptido VC15. En azul se encuentran representados los residuos positivos; en amarillo se representan los residuos no polares o hidrofóbicos; en morado se representan las serinas; en verde se representan las prolinas y en gris alaninas y glicinas.

### 7.1.1 Generación de variantes a través de aminoácidos conservados

Para determinar aminoácidos conservados, se llevó a cabo una búsqueda en las siguientes bases de datos:

- Antimicrobial Peptide Database (APD, disponible en: <https://aps.unmc.edu/>)
- Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP, disponible en: <https://dbaasp.org/>)
- Data Repository of Antimicrobial Peptides (DRAMP, disponible en: <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>)



## 7.2 Análisis de componentes principales

A partir de las secuencias recopiladas de las bases de datos mencionadas previamente, se realizó un análisis de componentes principales mediante una matriz de correlación. Para llevar a cabo este análisis multivariado, se empleó el software estadístico Minitab 19, el cual está disponible en: <https://www.minitab.com/es-mx/>. Para obtener los datos de los descriptores moleculares de los péptidos, se utilizó el programa “Peptides”, que forma parte del paquete de programación R (Osorio et al., 2015). Este programa proporcionó detalles acerca del peso molecular, carga neta, punto isoeléctrico, índice alifático, índice de inestabilidad, índice de Boman, índice de hidrofobicidad y momento hidrofóbico de cada secuencia.

La predicción de la hemólisis para cada secuencia se obtuvo mediante el servidor HemoPi. Se empleó la herramienta “Virtual Screening” junto con el método HemoPI-2 SVM + Motif, que asignó a cada secuencia una puntuación en una escala que varía de 0 a 1, donde valores cercanos a 1 indican una mayor propensión a la hemólisis (Anexo D). Con el análisis de componentes principales se pueden observar correlaciones entre descriptores moleculares y actividades no deseadas como la hemólisis, debido a esto, la correlación de las variantes diseñadas con estos descriptores fue un parámetro para la deserción de variantes con esta actividad no deseada (Greco *et al.*, 2020).

## 7.3 Estudio de interacción mediante los servidores “FMAP2.0” y “PPM3.0”

Una vez obtenidas las variantes, se emplearon los servidores "FMAP2.0" y "PPM3.0" para predecir la capacidad de los péptidos de formar una estructura de alfa hélice estable en membranas lipídicas. Estos servidores también facilitaron la generación de modelos con todos los átomos (All-atom) de la interacción del péptido con las membranas lipídicas. El servidor "PPM 2.0", basado en el modelo de posicionamiento de proteínas en membranas, calcula las energías de unión y las posiciones espaciales de moléculas como proteínas y péptidos (Lomize *et al.*, 2011).

## 7.4 Predicción de estructura secundaria

La predicción de la estructura terciaria se llevó a cabo utilizando los servidores I-TASSER (Yang et al., 2015) y PEP-FOLD3.5 (Lamiable et al., 2016). Estos servidores fueron seleccionados debido a su capacidad para predecir estructuras de péptidos con menos de 30 aminoácidos con una precisión del 95%, con variaciones en la desviación cuadrática media o RMSD (Root Mean Square Deviation) de 0.08 a 2.0 Å.

Las variantes se modelaron en I-TASSER utilizando plantillas de proteínas identificadas por LOMETS (Local Meta-Threading Server). Este último aplica un método de lectura y alineación de secuencias depositadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB), generando una predicción de estructura 3D basada en la secuencia de mayor similitud y el menor Z-score. La mejor estructura de cada variante se seleccionó en función del C-score, que se puntúa en un rango de -5 a 2, siendo la estructura con el C-score más alto la más confiable

Para validar la predicción de la estructura tridimensional de las variantes, se empleó la herramienta "web-based *de novo*" PEP-FOLD3. Este algoritmo utiliza una secuencia en formato FASTA de las variantes que se desean modelar. El algoritmo se configuró para llevar a cabo 100 simulaciones, y los modelos resultantes se clasificaron según sus energías sOPEP, siendo el mejor modelo aquel que obtuvo la menor energía

## 7.5 Estudios de dinámica molecular

Las estructuras utilizadas en este trabajo comprendieron las variantes (VC15FL, VC15H, VC15HK y VC15RH) y VC15, previamente obtenidas mediante el servidor ITASSER en formato PDB. Los estados de protonación se asignaron utilizando la herramienta PDB2PQR (Disponible en: <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) considerando un pH de 7.5. Se analizó el comportamiento del péptido por dinámica molecular tanto en forma transmembranal (TM) como fuera de la membrana, a una distancia de 3 Å, en un mismo sistema. Esto se realizó para optimizar los recursos computacionales y examinar diversas interacciones del sistema. Además, se estudió el comportamiento de los péptidos en solución acuosa; para ello, se insertó una

molécula de cada péptido en una caja de  $10 \times 10 \times 10 \text{ nm}^3$ . Todos los sistemas se construyeron por cuadruplicado utilizando la herramienta "Membrane Builder" del servidor CHARMM-GUI (Disponible en: <https://www.charmm-gui.org/?doc=input>). Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el software GROMACS 2019.2 (Abraham *et al.*, 2015), utilizando el campo de fuerza CHARMM36m (Huang *et al.*, 2017). La temperatura se mantuvo a  $303.15 \text{ °K}$  y los sistemas se acoplaron por separado (péptido y solvente). Se empleó un intervalo de tiempo (time step) de 2 femtosegundos (fs) para el integrador (leap-frog). El movimiento de hidrógenos se ajustó mediante el algoritmo LINCS. Para calcular las fuerzas electrostáticas, se aplicó el algoritmo "Particle mesh Ewald" con un radio de corte (Cutoff) de 1.2 nm. Las condiciones se detallan en la tabla 4 para cada sistema analizado.

Tabla 4: Características de los sistemas diseñados para el estudio de dinámica molecular.

<b>PÉPTIDO</b>	<b>SISTEMA</b>	<b>CONFORMACIÓN</b>	<b>NUMERO ÁTOMOS</b>	<b>TIEMPO SIMULACIÓN</b>
PIN2	POPC/POPG 8:2	Monómero TM	68317	250 ns
VC15	POPC/POPG 8:2	Monómero TM Monómero extracelular	68468	500 ns
	Acuoso	Monómero	18299	500 ns
VC15FL	POPC/POPG 8:2	Monómero TM Monómero extracelular	68468	500 ns
	Acuoso	Monómero	18299	500 ns
VC15H	POPC/POPG 8:2	Monómero TM Monómero extracelular	68468	650 ns
	Acuoso	Monómero	18299	500 ns
VC15HK	POPC/POPG 8:2	Monómero TM Monómero extracelular	68468	650 ns
	Acuoso	Monómero	18299	500 ns
VC15RH	POPC/POPG 8:2	Monómero TM Monómero extracelular	68468	650 ns
	Acuoso	Monómero	18299	500 ns

Una vez finalizada la etapa de simulación, se procedió a emplear el programa g\_lomepro (Gapsys *et al.*, 2013) para llevar a cabo una evaluación de diversos parámetros en la membrana. Entre estos parámetros se incluyen el grosor y el área por lípido, los cuales ayudan a definir el sistema con y sin péptido, lo que permite la interpretación de la dinámica de interacción. Además, se utilizaron las herramientas facilitadas por GROMACS para llevar a cabo un análisis de la densidad tanto de los péptidos como de las cabezas polares de los lípidos en los tramos iniciales y finales de cada simulación, abarcando 100 ns en cada extremo. Asimismo, se realizó un estudio del recorrido del péptido a lo largo de la totalidad de la simulación, permitiendo una comprensión detallada de su comportamiento y sus interacciones con la membrana lipídica.

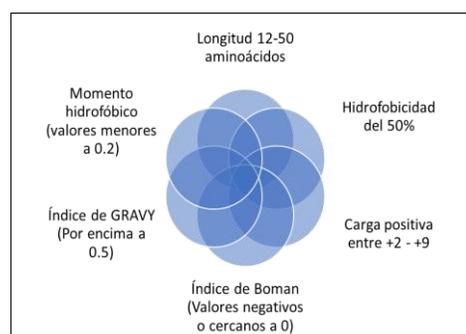
## 7.5 Caracterización bioinformática de los péptidos seleccionados

Como se describió anteriormente, los PAMs tienen características fisicoquímicas que definen su potencial antibacteriano. Para caracterizar los péptidos que se obtuvieron a partir de las pruebas computacionales, se empleó el programa “Peptides” (Osorio *et al.*, 2015). Que utiliza el paquete de programación R y que nos ofrece un cálculo de las diferentes características fisicoquímicas que son importantes para los PAMs (Figura 8).

### 7.5.1 Caracterización mediante servidores

En la actualidad, existen múltiples servidores web gratuitos que desempeñan un papel fundamental en diversos aspectos de la bioinformática. En el ámbito específico de los péptidos antimicrobianos, se encuentran

disponibles servidores que brindan una evaluación exhaustiva de las secuencias de péptidos, ofreciendo información valiosa para distintos propósitos. En este estudio, hemos utilizado los siguientes servidores:



**Figura 8.** Características fisicoquímicas presentes en los PAMs (Osorio *et al.*, 2015)

- a) Antimicrobial Peptide Scanner vr2: Este servidor asigna una puntuación a los péptidos de interés en una escala del 0 al 1, donde un valor de 1 indica una mayor probabilidad de ser un péptido bioactivo. Puede accederse a través del siguiente enlace: <https://www.dveltri.com/ascan/v2/about.html> (Veltri *et al.*, 2018).
- b) iAMPpred: Un servidor que predice la actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral de nuestras secuencias peptídicas. Se encuentra disponible en: <http://cabgrid.res.in:8080/amppred/index.html> (Meher *et al.*, 2017).
- c) HemoPi: Ofrece una predicción sobre la propensión hemolítica de nuestras secuencias peptídicas. Puede accederse aquí: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hemopi/index.php> (Chaudhary *et al.*, 2016).
- d) ToxinPred: Este servidor evalúa la toxicidad de las secuencias peptídicas. Puede consultarse en: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html> (Gupta *et al.*, 2013).
- e) AllerTOP v. 2.0: Utilizamos este servidor para identificar posibles efectos alérgicos en nuestras variantes. Puede accederse a través de: <http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html> (Dimitrov *et al.*, 2014).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Variantes generadas a partir de la modificación de la proyección helicoidal

A través de esta estrategia, se generaron un total de 19 variantes que se encuentran visualizadas en el Anexo A donde se encuentran las proyecciones helicoidales obtenidas. La tabla 5 detalla las secuencias y características fisicoquímicas de estas variantes propuestas.

### 8.2 Variantes obtenidas a partir de la búsqueda de aminoácidos conservados

Se obtuvieron un total de 217 secuencias de péptidos de las tres bases de datos con los criterios de longitud de 12 a 15 aminoácidos, sin ninguna modificación ni presencia de aminoácidos inusuales y estructura de alfa helice. Se generó el Anexo B donde se encuentran depositadas cada secuencia junto con los descriptores moleculares utilizados. Posteriormente, se procedió a alinear estas secuencias en función de su longitud mediante la herramienta MUSCLE del servidor ClustalOmega (Madeira *et al.*, 2022, disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se visualizaron para su análisis utilizando el software Jalview 2.11.2.2 y el servidor WebLogo (Waterhouse *et al.*, 2009). Con los alineamientos completados, se obtuvo una secuencia consenso de cada base de datos, la cual se utilizó posteriormente en la generación de variantes y también, después de visualizarse y analizarse se generó el anexo B y C donde se encuentran los alineamientos realizados y las graficas de la conservacion de aminoacidos observada a traves de los alineamientos realizados.

Utilizando esta metodología, se generaron un total de 18 variantes (Tabla 6) que posteriormente fueron sometidas a análisis mediante la herramienta "Peptides" para obtener las características fisicoquímicas de cada secuencia y determinar si cumplen con los rangos establecidos previamente.

**Tabla 5.** Variantes obtenidas mediante la modificación de la proyección helicoidal del péptido VC15 y sus características fisicoquímicas.

VARIANTE	SECUENCIA	CARGA NETA	% DE RESIDUOS HIDROFOBICOS	ÍNDICE DE BOMAN	GRAVY (HIDROPATICIDAD)	ÍNDICE DE MOMENTO HIDROFOBICO	ÍNDICE DE HIDROFOBICIDAD
<b>VC15-LV1</b>	FWKALAKGALKLIPS	3	60	-0.75	0.58	0.57	0.29
<b>VC15-LV1.1</b>	FWKKLAKGALKLIPS	4	53	-0.26	0.20	0.71	0.15
<b>VC15-LV1.2</b>	FWKKLLKGALKLIPS	4	53	-0.47	0.30	0.73	0.18
<b>VC15-LV1.3</b>	FWKKLLKWALKLIPS	4	60	-0.56	0.30	0.72	0.20
<b>VC15-LV1.4</b>	FWKKLLKWLKLLIPS	4	60	-0.77	0.43	0.76	0.23
<b>VC15-LV1.5</b>	FWKKLLKWLKLLIPS	5	53	-0.07	-0.08	0.83	0.06
<b>VC15-GV2.2</b>	FWKGGKGALKLIPS	4	40	0.06	-0.22	0.66	0.10
<b>VC15-GV2.3</b>	FWKGGKWALKLIPS	4	47	-0.03	-0.26	0.66	0.12
<b>VC15-GV2.4</b>	FWKGGKWGLKLLIPS	4	40	0.02	-0.40	0.64	0.11
<b>VC15-GV2.5</b>	FWKGGKWGKLLIPS	5	33	0.72	-0.92	0.72	-0.06
<b>VC15-IV3.2</b>	FWKKIIGALKLIPS	4	53	-0.47	0.42	0.77	0.22
<b>VC15-IV3.3</b>	FWKKIIKWALKLIPS	4	60	-0.56	0.39	0.76	0.24
<b>VC15-IV3.4</b>	FWKKIIKWILKLLIPS	4	60	-0.77	0.57	0.83	0.29
<b>VC15-IV3.5</b>	FWKKIIKWIKLLIPS	5	53	-0.07	0.06	0.89	0.12
<b>VC15-VV3.2</b>	FWKKVVKGALKLIPS	4	53	-0.35	0.39	0.73	0.18
<b>VC15-VV3.3</b>	FWKKVVKWALKLIPS	4	60	-0.44	0.35	0.72	0.20
<b>VC15-VV3.4</b>	FWKKVVKWVLLIPS	4	60	-0.59	0.51	0.77	0.23
<b>VC15-VV3.5</b>	FWKKVVKWVKLLIPS	5	53	0.10	0.00	0.84	0.06
<b>VC15-FL</b>	FWKFALFWFFKLIPS	2	73	-1.44	1.06	0.38	0.58

Tabla 6. Variantes propuestas mediante cambios puntuales utilizando aminoácidos conservados.

VARIANTE	SECUENCIA	CARGA NETA	% DE RESIDUOS HIDROFOBICOS	ÍNDICE DE BOMAN	GRAVY (HIDROPATICIDAD)	ÍNDICE DE MOMENTO HIDROFOBICO	ÍNDICE DE HIDROFOBICIDAD
VC15-KG	FWGALAKGALKL <b>IKG</b>	3	60	-1.11	0.68	0.62	0.36
VC15-VIKG	FWGALAKGALK <b>VIKG</b>	3	60	-1.05	0.71	0.62	0.36
VC15-L	FWGALLKGALK <b>VIKG</b>	3	60	-1.25	0.84	0.64	0.39
VC15-K	<b>K</b> FWGALLKGALK <b>VIKG</b>	4	56	-0.83	0.55	0.64	0.27
VC15-HG	<b>H</b> FWGALLKGALK <b>VIKG</b>	3	56	-0.89	0.59	0.64	0.34
VC15-R	<b>R</b> FWGALLKGALK <b>VIKG</b>	4	56	-0.24	0.51	0.64	0.21
VC15-H	<b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>H</b> VI <b>H</b> G	0	56	-1.05	0.72	0.37	0.55
VC15-RRRR	<b>R</b> FWGALL <b>R</b> GAL <b>R</b> VI <b>R</b> G	4	56	1.51	0.4	0.89	0.01
VC15-KKHH	<b>K</b> FWGALL <b>K</b> GAL <b>H</b> VI <b>H</b> G	2	56	-0.94	0.63	0.47	0.41
VC15-HKHH	<b>H</b> FWGALL <b>K</b> GAL <b>H</b> VI <b>H</b> G	1	56	-1.00	0.6	0.47	0.48
VC15-HHHK	<b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>H</b> VI <b>K</b> G	1	56	-1.00	0.68	0.45	0.48
VC15-HK	<b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>K</b> VI <b>K</b> G	2	56	-0.94	0.63	0.54	0.41
VC15-HKH	<b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>K</b> VI <b>H</b> G	1	56	-1.00	0.68	0.47	0.48
VC15-RFH	<b>R</b> FWGALL <b>R</b> GAL <b>H</b> VI <b>H</b> G	2	56	0.23	0.56	0.63	0.28
VC15-HF	<b>H</b> FWGALL <b>R</b> GAL <b>H</b> VI <b>H</b> G	1	56	-0.41	0.64	0.56	0.41
VC15-RF	<b>R</b> FWGALL <b>R</b> GAL <b>R</b> VI <b>K</b> G	4	56	0.93	0.43	0.82	0.08
VC15-HFH	<b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>H</b> VI <b>R</b> G	1	56	-0.41	0.6	0.53	0.41
VC15-RH	<b>R</b> <b>H</b> FWGALL <b>H</b> GAL <b>H</b> VI <b>R</b> G	2	53	0.49	0.34	0.53	0.24

### 8.2.1 Análisis de componentes principales

Se logró observar una correlación entre el porcentaje de residuos hidrofóbicos y la hemolisis (Figura 9. Circulo sombreado en negro), esto ya se ha reportado en anteriores trabajos (Dathe et al., 1997; Chen et al., 2007; Hollmann et al., 2016) y debido a esto, 12 variantes encontradas en esta región de la gráfica fueron descartadas por su relación con esta actividad no deseada.

Análisis de clustering mediante PCA para correlación de descriptores moleculares y hemolisis

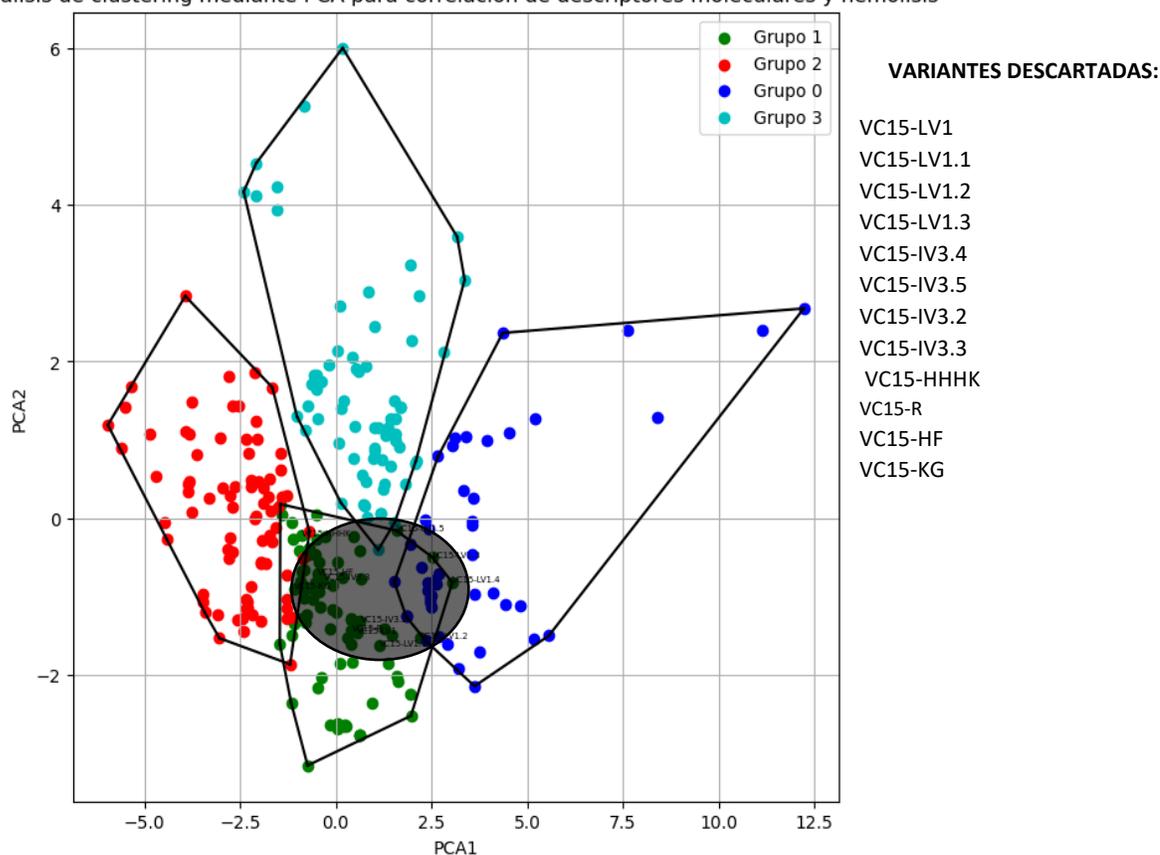


Figura 9. Análisis de componentes principales. 4 grupos fueron obtenidos mediante agrupamiento dado por el k-mean.

### 8.3 Estudio de interacción péptido-membrana mediante el servidor FMAP 2.0

En los últimos años, ha aumentado considerablemente la utilización de servidores web para predecir diversas actividades relacionadas con el diseño de péptidos antimicrobianos (Liu et al., 2017; Xu et al., 2021), así como para anticipar la topología de los péptidos y su interacción con membranas lipídicas de tipo bacteriano (Lomize et al., 2012; Lomize et al., 2022).

En este estudio, se seleccionaron las variantes que presentaron la mejor interacción, medida en kcal/mol, y profundidad de inserción en Angstroms (Å) con FMAP2.0 server. Se utilizó como modelo una membrana Gram- y se establecieron como condiciones 300 °K y pH 7.5 (Tabla 7). Este análisis se realizó considerando que las variantes propuestas presentan una estructura de alfa hélice, confirmado para las variantes VC15FL, VC1H, VC15H y VC15RH mediante predicciones de estructura secundaria utilizando I-TASSER y PEP-FOLD3.5. Es relevante mencionar que la entrada de datos en este servidor se realiza proporcionando la secuencia de aminoácidos en formato FASTA e indicando la propensión de la secuencia a adoptar una estructura de tipo alfa-hélice.

Tabla 7. Resultados obtenidos a partir del estudio péptido-membrana con las variantes propuestas.

<b>PÉPTIDO</b>	<b>ENERGÍA DE UNIÓN (KCAL/MOL)</b>	<b><math>\Delta G</math> DE TRANSFERENCIA (KCAL/MOL)</b>	<b>PROFUNDIDAD (Å)</b>
VC15	-4.2	-6.6	5.1
VC15-LV1	-4.2	-6.8	6.5
VC15-LV1.1	-4.2	-6.7	5.2
VC15-LV1.2	-4.7	-8.3	7.3
VC15-LV1.3	-6.1	-7.6	5.3
VC15-LV1.4	-6.6	-8.8	7.6
VC15-LV1.5	-6.1	-7.2	5.4
VC15-GV2.2	-3.7	-5.9	4.6
VC15-GV2.3	-5.1	-6.8	5.7
VC15-GV2.4	-5.1	-6.5	3.1
VC15-GV2.5	-4.6	-6.8	3.1
VC15-IV3.2	-4.1	-6.6	4.7
VC15-IV3.3	-5.5	-7.1	4.9
VC15-IV3.4	-5.7	-7.1	6.3
VC15-IV3.5	-5.2	-6.9	4.8
VC15-VV3.2	-3.9	-6.7	5.8
VC15-VV3.3	-5.3	-6.9	3.7
VC15-VV3.4	-5.4	-7.3	6.1
VC15-VV3.5	-4.9	-7.4	4.7
VC15-FL	-9.7	-8.5	9.6
VC15-KG	-4.2	-6.9	5.9
VC15-VIKG	-3.8	-6.4	5
VC15-L	-4.3	-7.5	6.9
VC15-K	-4.3	-6.5	5.2
VC15-HG	-4.3	-6.3	9
VC15-R	-4.3	-6.9	5.1

VC15-H	-4.3	-6.8	26
VC15-RRRR	-4.3	-7.3	4.8
VC15-KKHH	-4.3	-6.7	5.1
VC15-HKHH	-4.3	-6.4	9
VC15-HHHK	-4.3	-6.8	5.2
VC15-HK	-4.3	-6.3	8.9
VC15-HKH	-4.3	-6.6	5.2
VC15-RFH	-4.3	-7	6.1
VC15-HF	-4.3	-7	5.2
VC15-RF	-4.3	-7.2	4.8
VC15-HFH	-4.3	-6.1	4.3
VC15-RH	-4.3	-6.5	26.2

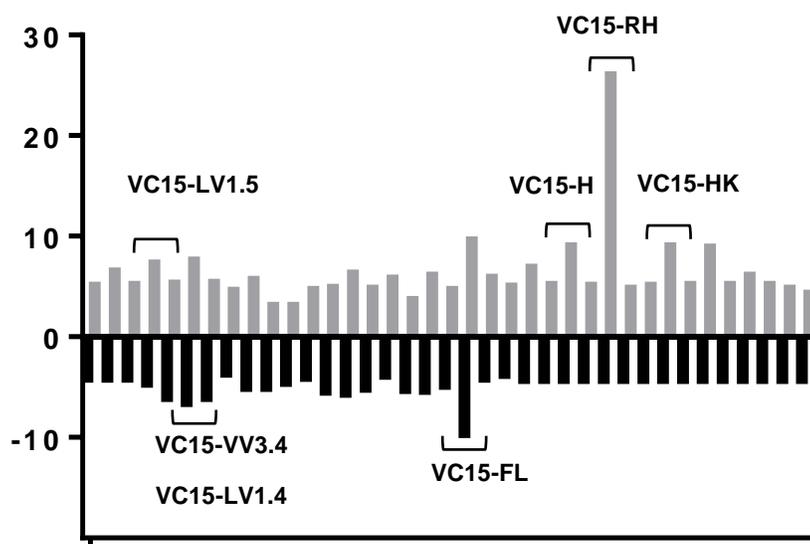


Figura 10. Grafica de barras representando las variantes escogidas debido a su mayor profundidad de penetración y energía de unión.

Las variantes VC15RH, VC15HK, VC15H y VC15LV1.5 fueron escogidas debido a que presentaron la mejor profundidad de penetración en este estudio y las variantes VC15FL, VC15VV3.4 y VC15LV1.4 fueron seleccionadas por la mejor energía de unión, todo esto comparando los resultados obtenidos para el péptido VC15.

En total, se descartaron 18 variantes según este criterio, y se seleccionaron 7 variantes para su caracterización adicional.

#### 8.4 Caracterización biológica de las variantes mediante servidores

Las variantes seleccionadas fueron caracterizadas mediante el uso de servidores enfocados al diseño y predicción de péptidos bioactivos que aplican herramientas de aprendizaje profundo, estos, otorgan una puntuación a la secuencia de interés. Los servidores utilizados fueron: Antimicrobial Peptide Scanner vr2, iAMPpred, Peptide Ranker, HemoPi, ToxinPred, AllerTOP v. 2.0. En la tabla 8 se observan los péptidos VC15RH, VC15H, VC15HK y VC15FL que destacan debido a las predicciones favorables tanto de actividades deseadas como no deseadas. Los controles utilizados fueron: VC15, LL-37 e Indolicin cuya caracterización con estos servidores se acerca en 90 % de acuerdo a los valores de actividad antibacterial y hemolítica.

**Tabla 8.** Caracterización biológica de las variantes obtenidas; Antimicrobial Peptide Scanner vr. 2: Probabilidades >0.5 = PAM predicho; iAMPpred: otorga calificaciones del 0 al 1 siendo 1 más probable a tener la actividad seleccionada. Peptide Ranker: predicciones >0.5 = péptido bioactivo; HemoPi: predicciones >0.5 = probabilidades a ser hemolítico.

VARIANTE	Antimicrobial Peptide Scanner	IAMP PRED TOOL			Peptide Ranker	HemoPi	ToxinPred	AllerTop	Actividad anti-biofilm
		Antibacterial	Antiviral	Antifungico					
<b>PIN2</b>	1.000	0.94	0.68	0.92	0.83	0.83	No tóxico	No probable	Biofilm-inactive
<b>VC15</b>	0.999	0.94	0.8	0.9	0.79	0.61	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>LL-37</b>	0.999	0.6	0.82	0.85	0.94	0.72	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>INDOLICIN</b>	1.000	0.89	0.84	0.81	0.99	0.83	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>VC15-VV3.4</b>	1.000	0.84	0.9	0.67	0.81	0.47	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>VC15-LV1.4</b>	1.000	0.79	0.85	0.59	0.86	0.49	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>VC15-LV1.5</b>	1.000	0.87	0.82	0.66	0.87	0.49	No tóxico	No probable	Biofilm-active
<b>VC15-FL</b>	1.000	0.54	0.9	0.36	0.97	0.5	No tóxico	Probable	Biofilm-inactive
<b>VC15-H</b>	1.000	0.95	0.91	0.83	0.75	0.52	No tóxico	No probable	Biofilm-active
<b>VC15-HK</b>	1.000	0.99	0.95	0.98	0.84	0.53	No tóxico	Probable	Biofilm-active
<b>VC15-RH</b>	1.000	0.83	0.9	0.69	0.73	0.49	No tóxico	No probable	Biofilm-active

La variante VC15FL obtuvo un valor de 0.54 en la herramienta predictiva iAMP pred, lo que podría indicar que, en comparación con las demás variantes y los controles utilizados, esta variante podría presentar una menor actividad contra bacterias o tal vez se requieran concentraciones más elevadas para inhibir completamente su crecimiento. Por otro lado, en la predicción de actividad antiviral, todas las variantes obtuvieron valores superiores a 0.8, incluso más altos que los controles utilizados, lo que sugiere que las variantes podrían tener esta actividad particularmente la variante VC15HK que obtuvo un valor 79 % más alto que el valor más alto de los controles utilizados. En cuanto a la actividad antifúngica, destacan las variantes VC15H, VC15HK y VC15HK, que obtuvieron valores similares a los de los controles utilizados, indicando que estas variantes podrían exhibir esta actividad. Por último, en la predicción de actividad hemolítica, todas las variantes propuestas obtuvieron valores por debajo de 0.55 que es el 65% menor.

#### 8.4.1 Caracterización estructural de variantes

Según los resultados obtenidos, las variantes VC15H, VC15HK y VC15RH exhiben una estructura alfa-hélice completa, mientras que la variante VC15-FL muestra una estructura alfa-hélice en los aminoácidos 1-13, mientras que los aminoácidos 14-15 adoptan una estructura no definida, a menudo denominada "random coil". Es relevante destacar que las estructuras 3D generadas tanto por I-TASSER como por PEP-FOLD3.5 no presentaron diferencias significativas (Figura 11), lo que se reflejó en el valor del RMSD obtenido durante el análisis de superposición estructural. Los valores de RMSD, todos inferiores a 1 Å, indican una escasa disparidad en la disposición espacial de los átomos de carbono alfa en las estructuras (Carugo & Pongor, 2001).

MODELOS	C-SCORE obtenido de I-TASSER			
	VC15FL	VC15HK	VC15H	VC15RH
MODEL 1	-0.26	-0.1	-0.08	-0.13
MODEL 2	-5	-3.13	-5	-5
MODEL 3	-1.82	NP	-5	-5
MODEL 4	NP	NP	-5	-4.58

Tabla 9. C-scores obtenidos en los modelos para cada variante mediante el servidor I-TASSER. NP=no presentó.

MODELOS	Valores obtenidos de PEP-FOLD3.5							
	VC15FL		VC15HK		VC15H		VC15RH	
	sOPEP	tm	sOPEP	tm	sOPEP	tm	sOPEP	tm
MODEL 1	-46.6	0.248	-32.69	0.59	-29.1691	0.71	-31.15	0.466
MODEL 2	-23.91	0.203	-28.43	0.401	-24.9619	0.528	-30.01	0.426
MODEL 3	-23.17	0.379	-25.21	0.485	-23.3622	0.547	-27.99	0.389
MODEL 4	-22.84	0.183	-24.99	0.48	-23.101	0.465	-26.6	0.404

Tabla 10. Valores de sOPEP y tm obtenidos en cada modelo para las 4 variantes.

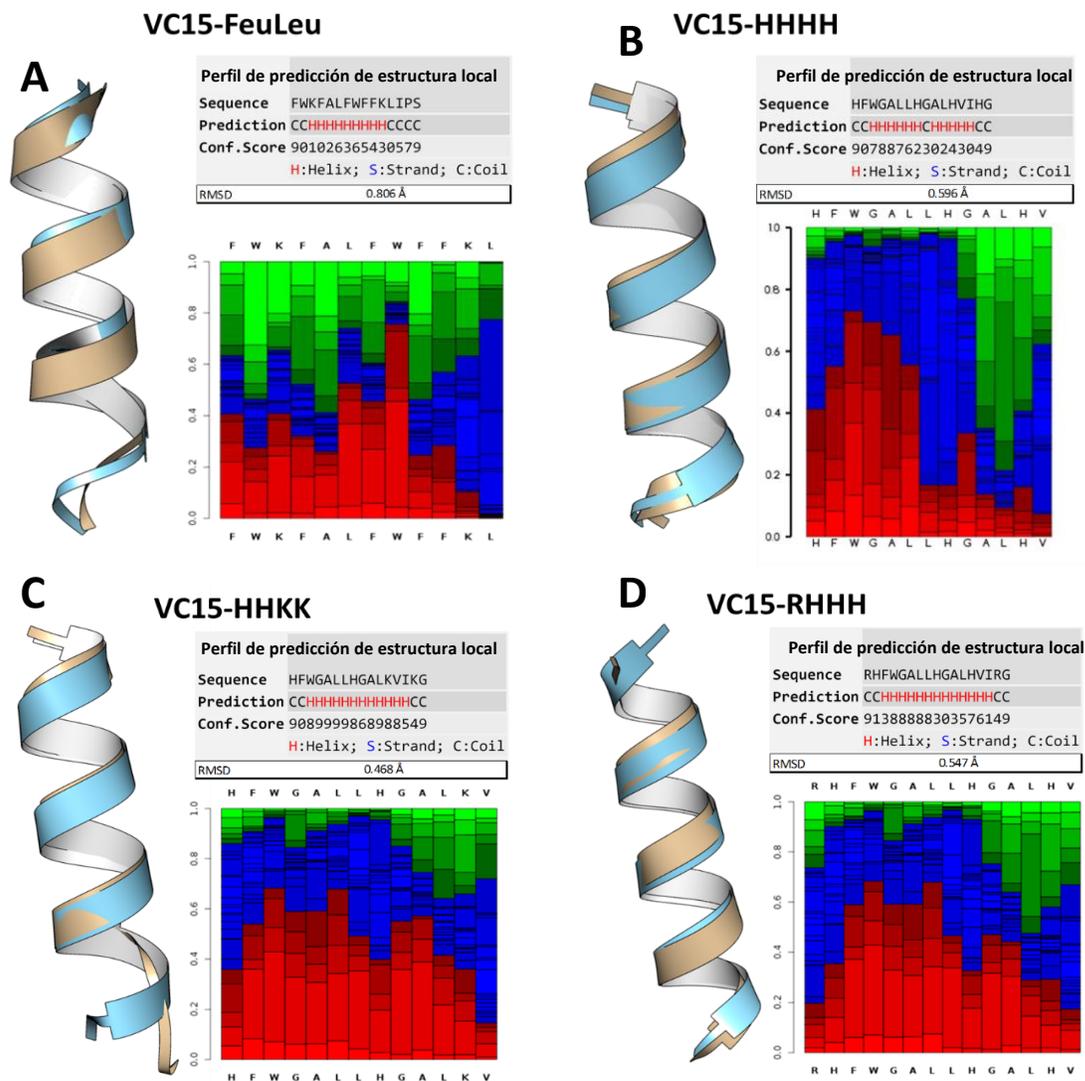


Figura 11. Estructuras 3D y predicción de estructura secundaria de variantes. Perfil de predicción de estructura local: Color rojo: hélice, azul: random coil, verde: extendido.

### 8.4.2 Orientación estructural péptido-membrana mediante el servidor PPM 3.0.

En general todas las variantes presentaron energías de transferencia buenas, siendo que energías más negativas son mejores que energías menos negativas o cercanas al 0. En comparación con el péptido VC15 las variantes VC15FL y VC15RH fueron las que obtuvieron mejores energías de transferencia de hasta -4 kcal/mol en el caso de la variante VC15FL y -0.4 kcal/mol en el caso de la variante VC15RH.

**Tabla 12.** Comparación de resultados obtenidos mediante el servidor PPM3.0 con algunos péptidos antimicrobianos caracterizados experimentalmente. NR= no reporta. SN= sin información.

Modelo de membrana Gram (-)						
Péptido/variante	Profundidad/ Densidad hidrofóbica (Å)	$\Delta$ transfer (kcal/mol)	Ángulo de inclinac ión (°)	Carga neta	% De residuos hidrofóbicos	Referencia
Pin2	10.2 ± 2.4	-13.6	107 ± 1	3	50	Este trabajo
VC15	7.1 ± 1.3	-10.5	112 ± 4	2	60	Este trabajo
VC15FL	29.5 ± 2.2	-14.7	4 ± 7	2.00	73	Este trabajo
VC15H	7.5 ± 2.0	-10.1	109 ± 15	0.00	56	Este trabajo
VC15HK	10.0 ± 2.5	-10.4	73 ± 5	2.00	56	Este trabajo
VC15RH	6.0 ± 0.7	-10.9	100 ± 6	2.00	53	Este trabajo
RTA3	6.8 ± 1.1	-8	82	6	63	Dahongsa <i>et al.</i> , 2013
CA-MA	8.2 ± 3.6	-12	85	8	45	Dahongsa <i>et al.</i> , 2013
BMAP-18	5.1 ± 0.5	-12.3	87	10	33	Dahongsa <i>et al.</i> , 2013
Ee-RL42	NR	NR	86	9	29	Pérez <i>et al.</i> , 2022
Sa-NN35	NR	NR	67	0	29	Pérez <i>et al.</i> , 2022
Cc-KL41	NR	NR	84	5	32	Pérez <i>et al.</i> , 2022
To-KL37	NR	NR	89	7	38	Pérez <i>et al.</i> , 2022
Hs-LL37	NR	NR	85	6	35	Pérez <i>et al.</i> , 2022
<i>A. mylitta</i> peptide fraction II	3.3 ± 1.46	-1.7	73 ± 21	0	30	Dutta <i>et al.</i> , 2017
O1	12.9 ± 1.1	-7.9	52 ± 1	1	48	Sekar <i>et al.</i> , 2021
V2A	13.2 ± 4.8	-5.9	52 ± 0	1	48	Sekar <i>et al.</i> , 2021
V3A	12.1 ± 0.8	-6.3	58 ± 7	1	48	Sekar <i>et al.</i> , 2021
D12A	13.8 ± 1.5	-10.2	28 ± 2	2	52	Sekar <i>et al.</i> , 2021
RN15	4.6	-5.2	71	3	46	Tankrathok <i>et al.</i> , 2019

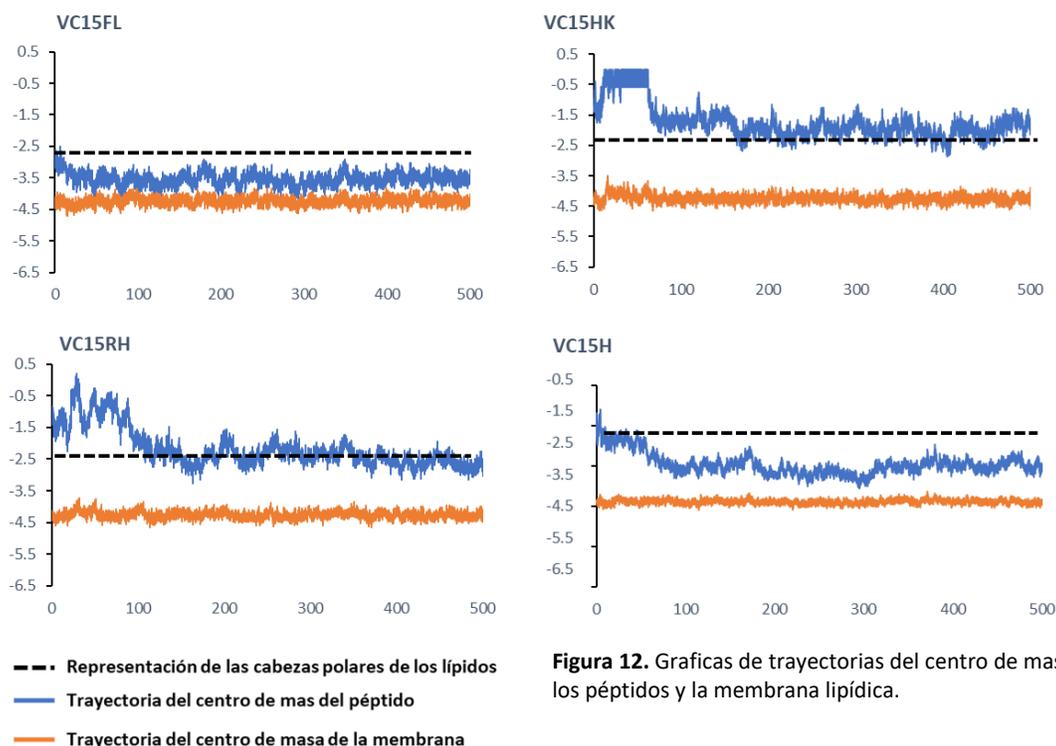
SI16	2.5	-3.4	75	-1	37	Tankrathok <i>et al.</i> , 2019
LL-37	8.6	NR	NR	6	35	Lim <i>et al.</i> , 2016
NLP-31	2.6	NR	NR	6	5	Lim <i>et al.</i> , 2016
Y43C5A.3	2.5	NR	NR	SN	SN	Lim <i>et al.</i> , 2016

De acuerdo con los datos obtenidos en cuanto a la capacidad de penetración de la membrana la variante VC15FL obtuvo la mejor penetración de hasta 29.5 Å siendo hasta 4 veces mayor en comparación con la del parental VC15 (7.1 Å) y casi 3 veces mayor a la del péptido Pin2 (10.2 Å), cabe resaltar que el ancho de la membrana que se modela en el servidor PPM3.0 es de entre 25-30 Å, lo que indica que el péptido VC15FL es capaz de penetrar completamente la membrana. Mientras que, en comparación con la penetración reportada de otros péptidos antimicrobianos caracterizados computacional y experimentalmente, la profundidad de penetración de la variante VC15FL es notablemente mayor (Tabla 12). Esto puede deberse al porcentaje de residuos hidrofóbicos que presenta la variante VC15FL (73%) dado por los cambios en las posiciones Gly4Feu, Lys7Feu, Gly8Trp, Ala9Feu, y Leu10Feu. El aminoácido Fenilalanina se ha reportado en péptidos antimicrobianos como un aminoácido que interactúa energéticamente y favorablemente con el interior hidrofóbico de la membrana bacteriana (Peng *et al.*, 2021). Por otra parte, las variantes VC15H, VC15HK y VC15RH obtuvieron valores de penetración de 7.5 Å, 10.0 Å y 6.0 Å respectivamente, los cuales son similares a los valores obtenidos en los péptidos VC15 y Pin2, además fueron mayores a la penetración reportada en los péptidos RN15 (4.6 Å), SI16 (2.5 Å) y LL-37 (8.6 Å) que son péptidos con actividad de amplio espectro (Lim *et al.*, 2016; Tankrathok *et al.*, 2019). La variante VC15FL obtuvo la mejor energía de transferencia entre el péptido y la membrana (-14.7 kcal/mol) siendo -1.1 kcal/mol menor a la energía de transferencia del péptido Pin2 (13.6 kcal/mol) y -4.2 kcal/mol menor a la del péptido parental VC15 (-10.5 kcal/mol). La energía de transferencia del péptido VC15FL es similar a la del péptido B-MAP18 (-12.3 kcal/mol) que es un péptido de amplio espectro y que presenta una CMI de 20µM frente a bacterias del tipo Gram- (Dahongsa *et al.*, 2013). Las variantes VC15H, VC15HK y VC15RH presentaron valores de energía de transferencia de -10.1, -10.4 y 10.9 kcal/mol respectivamente, que son similares a

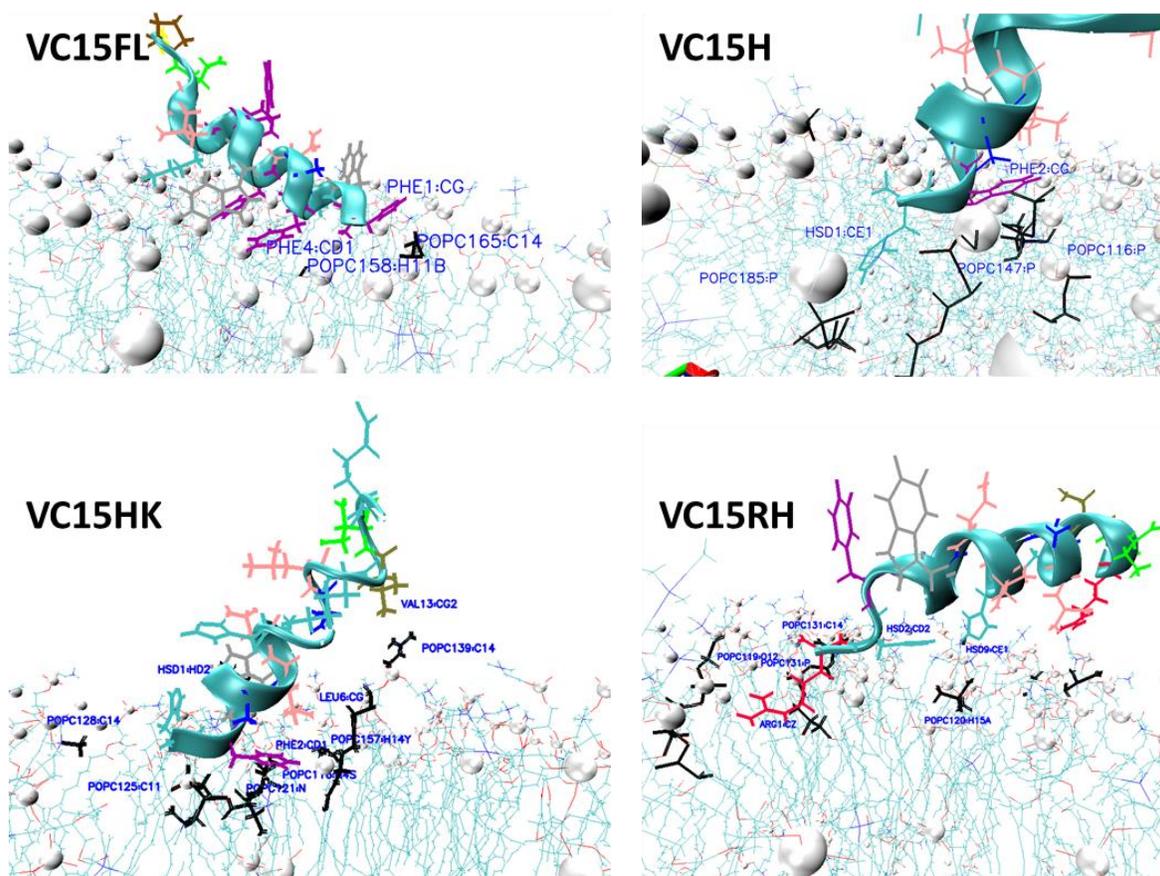
las energías de transferencia de los péptidos D12A (-10.2 kcal/mol) y CA-MA (-12 kcal/mol) (Dahongsa *et al.*, 2013; Sekar *et al.*, 2021). Con base en estos resultados, las variantes presentaron tanto penetración en la membrana como también energías de transferencia similares a las que presentan péptidos antimicrobianos caracterizados experimentalmente, lo cual podría indicar que las variantes presentarán actividad antibacteriana frente a bacterias del tipo Gram-.

### 8.5 Estudios de dinámica molecular: trayectoria de variantes

Las trayectorias de los centros de masa de los péptidos fueron analizadas con la herramienta de GROMACS “trajectory”. Las coordenadas obtenidas se graficaron junto con el centro de masa de la membrana lipídica (Figura 12). En general, los péptidos tardaron de 10 y 15 ns en unirse a la membrana lipídica, exceptuando las variantes VC15RH y VC15HK que tardaron hasta 100 ns para tener una unión estable en esta.



**Figura 12.** Graficas de trayectorias del centro de masa de los péptidos y la membrana lipídica.

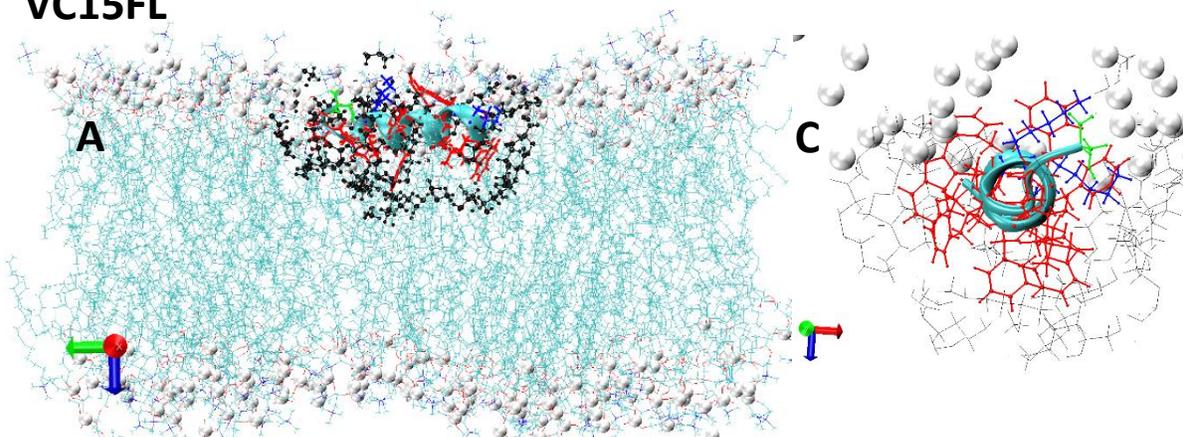


**Figura 13.** Primeras interacciones de los péptidos en el estudio de dinámica molecular. Los lípidos que interactúan con los péptidos se representan en líneas negras. Las cadenas laterales de los péptidos se representan en líneas de color dependiendo el aminoácido.

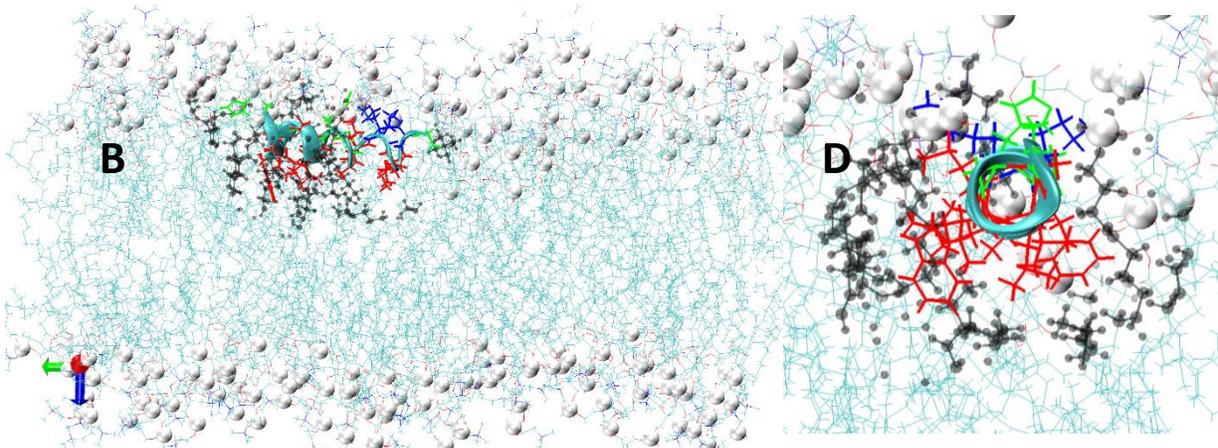
Las primeras interacciones entre péptido y membrana se dieron, en general, por el amino terminal siendo los lípidos POPC los primeros en interactuar con los péptidos. Particularmente, los aminoácidos F1 y F4 de la variante VC15FL interactuaron inicialmente con 2 lípidos. La variante VC15H con 3 lípidos mediante los aminoácidos H1 y F2. Por otra parte, la variante VC15HK presentó mayor cantidad de primeras interacciones mediante los aminoácidos H1, F2, L6 y V13 llegando a interactuar con 6 lípidos y por último la variante VC15RH interactúa con 3 lípidos mediante los aminoácidos R1, H2 e H9. A partir de estas interacciones

iniciales, podemos sugerir que los péptidos comenzaron a insertarse lateralmente a la membrana (Figura 13 y 14).

### VC15FL

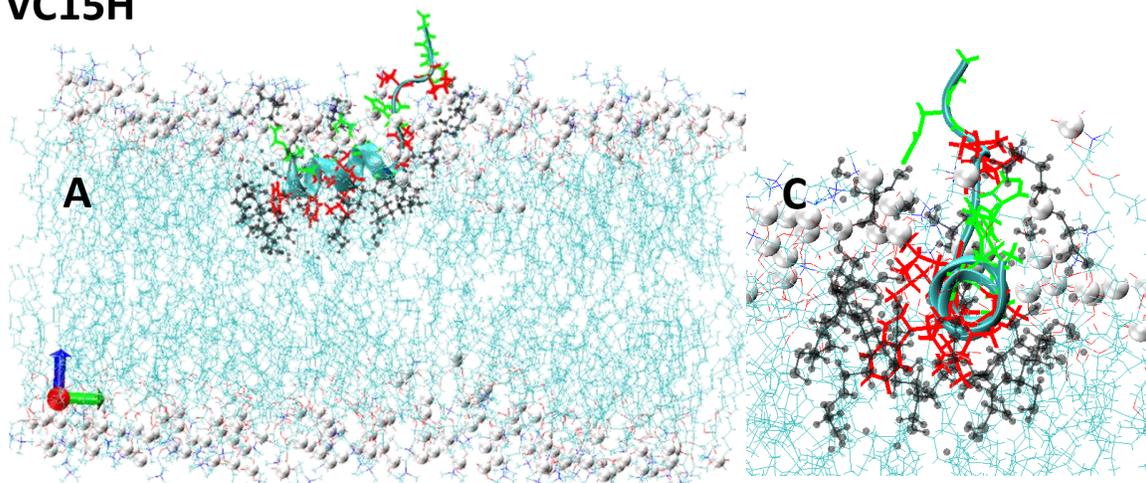


### VC15HK

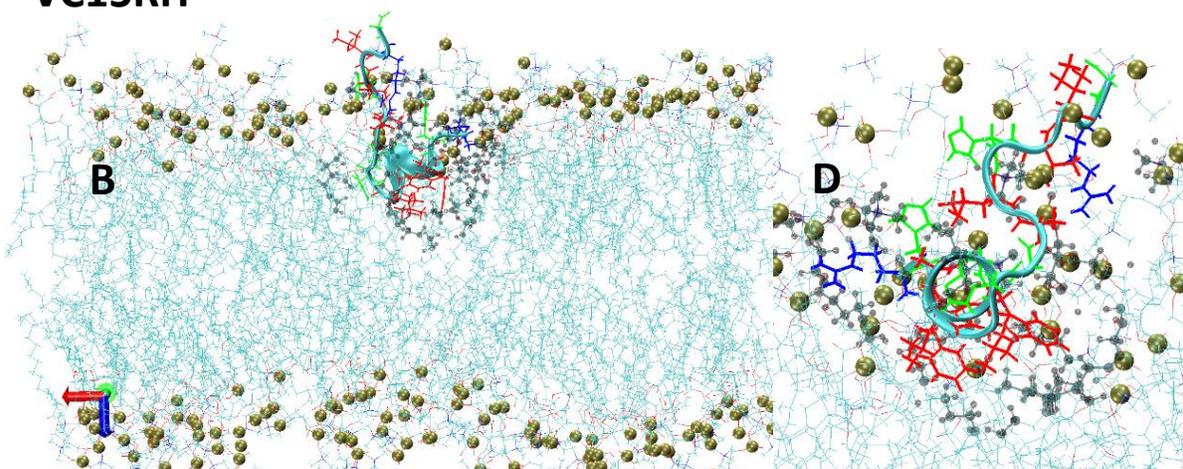


**Figura 14.** Estructura que representa el tiempo final de simulación de las variantes VC15FL y VC15HK. **A y B** representaciones de la vista lateral. **C y D** representaciones de la vista frontal de los péptidos. En negro se representan los lípidos que se encuentran interactuando con el péptido. Los péptidos se representan en “new cartoon” de color gris, las cadenas laterales se encuentran visualizadas en líneas y representadas en color por su propiedad. En azul aminoácidos cargados positivamente, en rojo aminoácidos aromáticos e histidinas y en verde aminoácidos polares. Los lípidos se encuentran representados en líneas verdes y el grupo fosfato de las cabezas polares está representado en esferas de color blanco. Las moléculas de agua y iones se ocultaron para una mejor visualización.

## VC15H



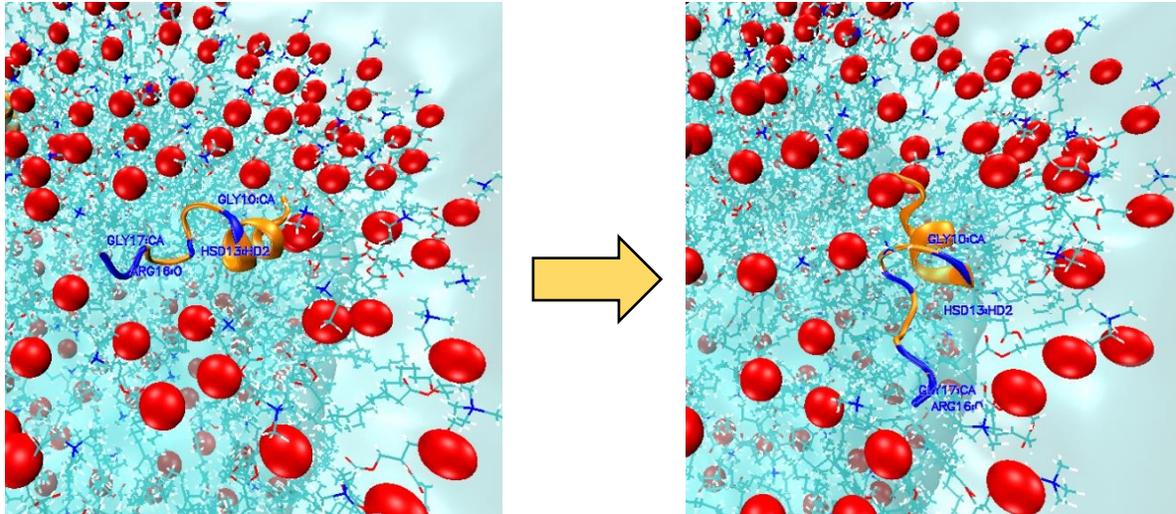
## VC15RH



**Figura 15.** Estructura que representa el tiempo final de simulación de las variantes VC15H y VC15RH. **A y B** representaciones de la vista lateral. **C y D** representaciones de la vista frontal de los péptidos. En negro se representan los lípidos que se encuentran interactuando con el péptido. Los péptidos se representan en “new cartoon” de color gris, las cadenas laterales se encuentran visualizadas en líneas y representadas en color por su propiedad. En azul aminoácidos cargados positivamente, en rojo aminoácidos aromáticos e histidinas y en verde aminoácidos polares. Los lípidos se encuentran representados en líneas verdes y el grupo fosfato de las cabezas polares está representado en esferas de color blanco. Las moléculas de agua y iones se ocultaron para una mejor visualización.

En general, los péptidos se insertan lateralmente en el interior de la membrana y se encuentran interactuando con lípidos POPC. En el péptido VC15FL solo los residuos F1, K3, A5, F7, F9, K13 y S15 se encuentran embebidos dentro de la membrana, mientras que el péptido VC15H se encuentra insertado del residuo H1 al L11, los aminoácidos restantes se encuentran en estructura no definida y a partir de la I14, se forma una “horquilla” que parece estar desplazando lípidos, esto es similar a lo observado con el péptido VC15RH donde a partir del residuo G10 se

forma una estructura no definida y los residuos H15 a G17 forman la “horquilla” que da cierto movimiento a la estructura, y que es capaz de desplazar a las cabezas polares de los lípidos (Figura 16).



**Figura 16.** Representación del movimiento y desplazamiento de lípidos causado por una “horquilla” a partir de aminoácido G10 en la estructura de VC15RH.

Se ha reportado mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que los péptidos Alamethicin y B-hairpin pasan por diferentes estados durante su interacción con la membrana durante el tiempo. Estudios realizados por Bechinger y Salnikov en el 2012 muestran que los estados que se presentan para la inserción de los péptidos en la membrana pueden ser tan variados como: rotaciones del péptido, deformación de la membrana y en general, transiciones topológicas del péptido, estas conductas suelen durar hasta 1 segundo para posteriormente se logren formar estados estables, donde el péptido se coloca verticalmente en la membrana (Bechinger & Salnikov, 2012). Mediante dinámica molecular, el campo de fuerza empleado en las simulaciones es de gran importancia. Un ejemplo de la utilización correcta de los campos de fuerza es el campo de fuerza CHARMM36, con el cual se han reportado tiempos de corrida en la magnitud de microsegundos ( $\mu$ s) donde los resultados *in-silico* corresponden a lo reportado en estudios “*in vitro*” (Lai & Kaznessis, 2018). Tal es el caso de los péptidos Alamethicin y Psicidin 1, que su inserción en membranas se reportó darse en tiempos de hasta 1  $\mu$ s (Perrin & Pastor, 2016).

Se ha relacionado que los aminoácidos aromáticos como Triptófano y Fenilalanina en posiciones cercanas al amino terminal son importantes para la actividad antimicrobiana de los PAMS. Tal es el caso del péptido Papiliocin, donde los residuos W2 y F5 son potentes reguladores de las interacciones que tiene este péptido con membranas de bacterias Gram- y particularmente el residuo W2 facilita la rápida permeabilización de este tipo de membranas (Lee *et al.*, 2015). También se ha sugerido que los aminoácidos cargados positivamente cercanos al amino terminal tienen roles importantes en la permeabilización, solubilización y formación de poros (Gor *et al.*, 2020) esto se puede deber a los cambios físicos que provocan en la membrana tanto como cambios en la curvatura, grosor y el desplazamiento de los lípidos contenidos en esta (Marquette & Bechinger, 2018; Corrêa *et al.*, 2019).

### **8.5.2 Análisis de grosor y lípido por área**

Existen diversos parámetros que nos indican el estado físico de una membrana, como lo es el grosor de la membrana y el número de Lípidos Por Área (APL). Usualmente se comparan los resultados de simulaciones con los observados mediante Rayos-X o resonancia magnética nuclear: 4.2 - 5.5 nm de grosor y 6.0 - 6.9 nm<sup>2</sup> APL dependiendo el tipo de lípido y la temperatura (Li *et al.*, 2012; Ashkar *et al.*, 2015; Faizi *et al.*, 2019). El promedio del grosor de la membrana y el APL debe coincidir durante todo el tiempo de simulación para validar los resultados y también es un indicador de perturbaciones en la membrana. El programa g\_lomepro, no solo sirve para cuantificar estos parámetros de manera global, sino que también analiza su variación de manera localizada durante el tiempo de simulación. La disminución del grosor de manera localizada se puede relacionar directamente con la perturbación causada por el péptido. El promedio del grosor se graficó por cuadruplicado en el programa GraphPadPrism 7, en líneas punteadas se representa la desviación estándar de cada sistema analizado (Figura 17).

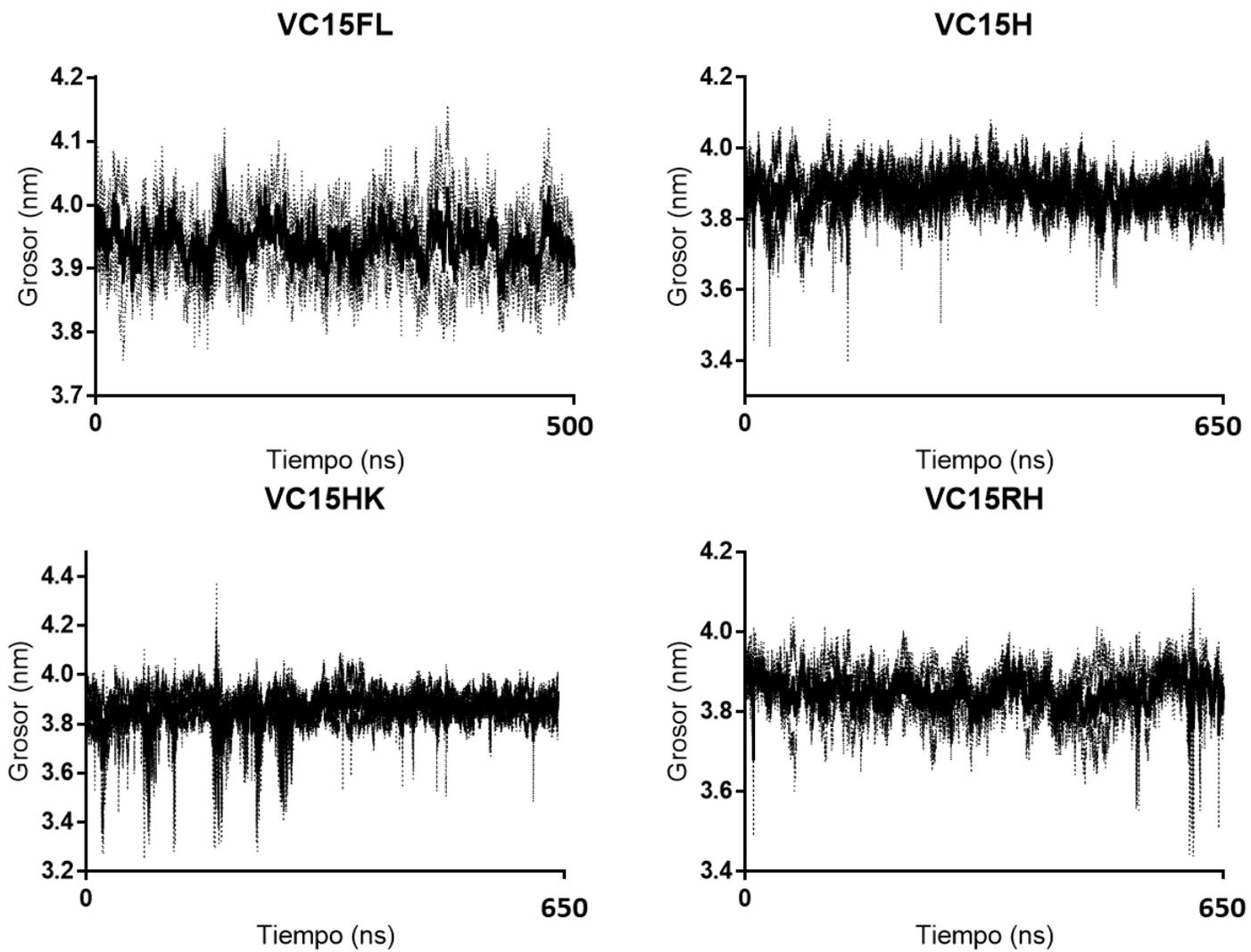
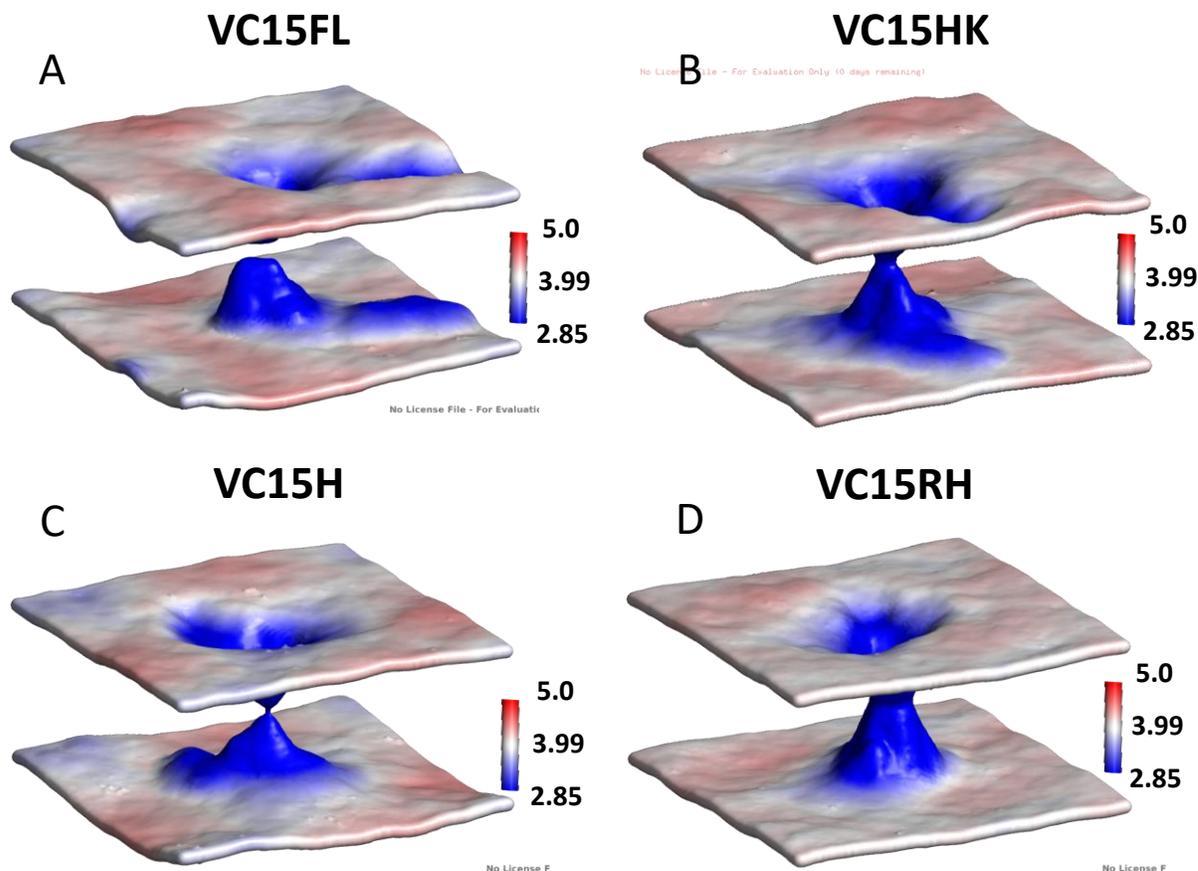


Figura 17. Media del grosor de la membrana en los sistemas analizados. Las líneas punteadas representan el error estándar de cada replica.

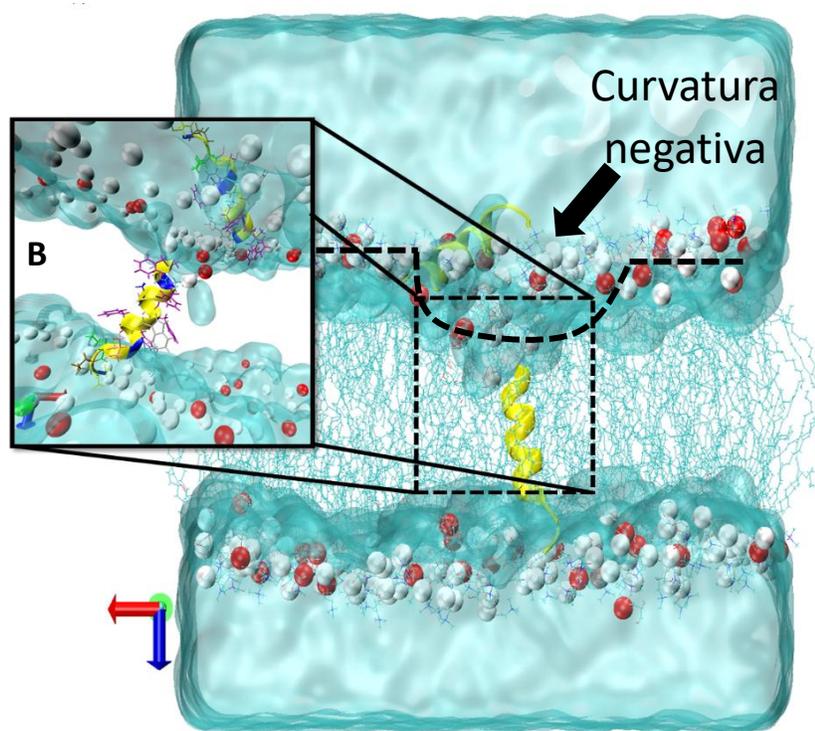
En general los valores de grosor se mantuvieron en los rangos reportados en la literatura (Ashkar *et al.*, 2015), sin embargo, al analizar el promedio de grosor local de los últimos 100 ns, existieron variaciones (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de grosor localizado. El cambio de grosor se representa en un gradiente de color “RGB” donde el color rojo representa el valor más alto de grosor en nanómetros y en azul el menor. Las representaciones se obtuvieron mediante la herramienta “thickness” del programa *g\_lomepro*. Se utilizó un valor de “bin” de 100 en el eje “X” y 100 en el eje “Y”.

El valor más bajo de grosor localizado se observó en el sistema VC15FL y fue de 1.59 nm, es decir, se disminuyó 2.59 nm con respecto al valor más alto que fue de 4.23 nm lo que indica una disminución del grosor de la membrana del 50 % (Figura 18 A), mientras que la variante VC15HK provocó la menor disminución del grosor siendo 1.01 nm tomando como referencia el valor mayor 4.15 nm y el menor 3.14 nm (Figura 18 B). La disminución del grosor de la membrana se ha reportado como un punto importante en la acción de los PAMS. El péptido Melitin, por ejemplo, induce la disminución del grosor de la membrana hasta un punto donde a pesar de aumentar la concentración de péptido, el grosor deja de disminuir, a partir de este

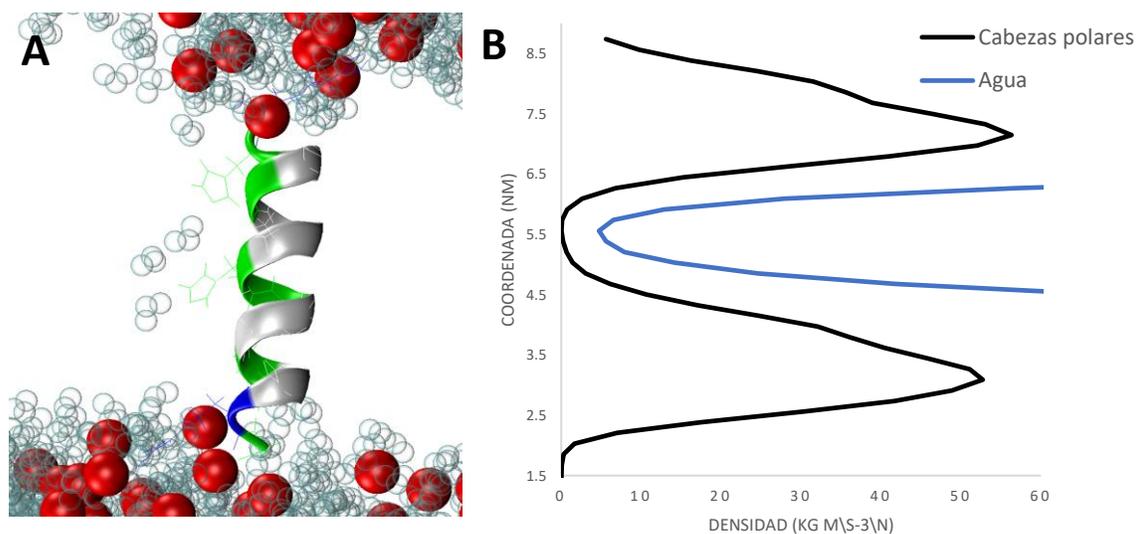
punto, poros transitorios comienzan a formarse y cuando la cantidad de péptido llega al punto de saturación, poros estables son formados (Huang, 2006; Huang & Charron, 2017). Sin embargo, otro punto que se destaca en la literatura es la relación péptido/lípido (P/L) reportado como punto importante para la inserción, en particular de péptidos cortos, a menores concentraciones los PAMS suelen únicamente colocarse lateralmente en las cabezas polares y que esta unión inicial suele crear bordes en la membrana debido a la disminución del grosor. Estos bordes son importantes para fomentar nuevas interacciones entre PAMS y la membrana (Henderson *et al.*, 2016). Este comportamiento fue observado en el sistema VC15RH donde el péptido en posición TM generó una curvatura negativa en la membrana, lo cual favoreció la interacción de la variante colocada en el exterior de la membrana (Figura 19).



**Figura 19.** Curvatura negativa generada en el sistema VC15FL que favoreció la interacción del péptido colocado lateralmente a la membrana. **B)** enfoque al péptido incrustado en la membrana donde se pueden apreciar moléculas de agua transitando en el interior de la membrana.

Otro parámetro importante de estudio es la permeabilización de la membrana, el cual es un mecanismo destructivo de los PAMS hacia la membrana, esto puede llevarse a cabo por la formación de poros, pero también se ha reportado que

péptidos individualmente pueden facilitar la permeabilidad de la membrana (Huang & Charron, 2017) y esto se puede deber al movimiento que ocasionado por la dispersión de lípidos que ocasionan los PAMS. Esto se observó en el sistema TM del péptido VC15RH (Figura 20)



**Figura 20.** Análisis de densidad en el sistema VC15RH. **A)** Visualización de moléculas de agua difundiéndose a través de la posición transmembranal del péptido VC15RH. **B)** Perfil de densidad en el sistema VC15RH. La línea negra representa la densidad de las cabezas de los fosfolípidos de la membrana y la línea azul representa la densidad de las moléculas de agua.

El análisis de lípido por área es un indicador que se ha aplicado en el estudio de los PAMS para relacionar la disminución de este parámetro con el daño físico que se puede ocasionar a la membrana. También, la media de este parámetro debe coincidir con la reportada en modelos de membranas (6.0 - 6.9 nm<sup>2</sup>). El APL de cada sistema fue analizado para observar los cambios de este parámetro durante el tiempo de dinámica. Este análisis fue realizado con la herramienta “APL” del programa g\_lomepro. Aunado al análisis de APL global, esta medida fue analizada de manera local, las estructuras se visualizaron mediante Pymol y la media de la APL fue graficada por cuadruplicado en el programa GraphPad Prism7. Las líneas punteadas indican la desviación estándar de cada muestra (Figura 21).

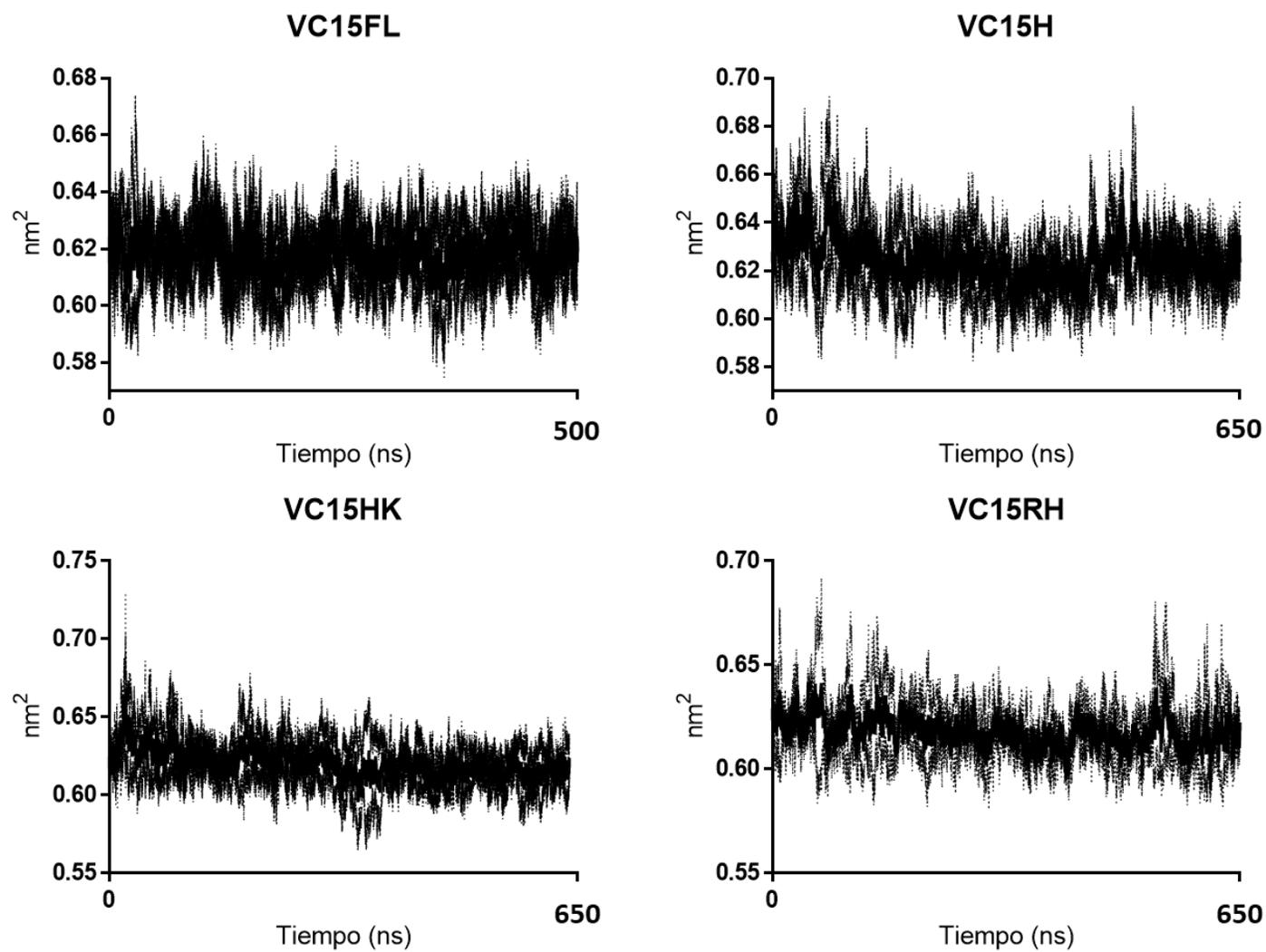
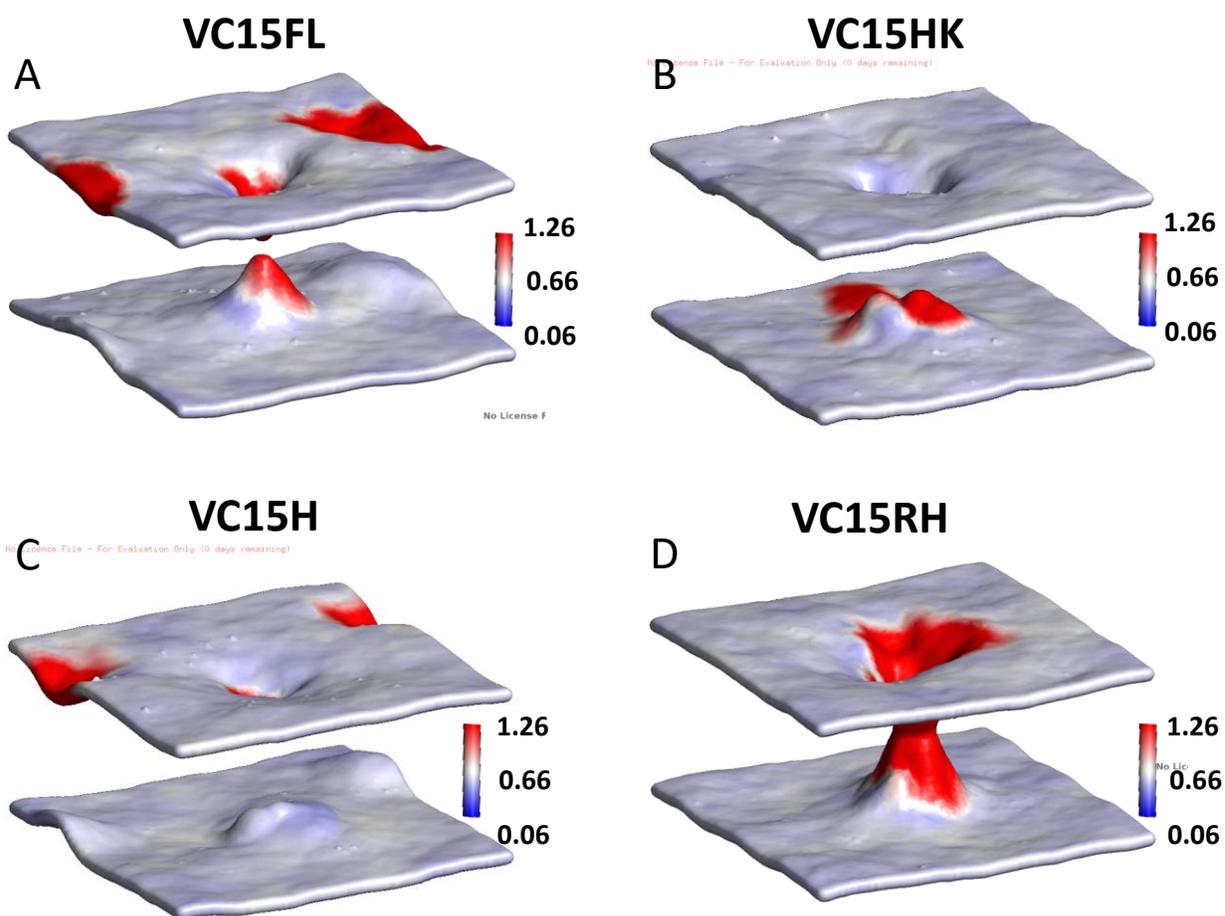


Figura 21. Media del APL de la membrana en los sistemas analizados. Las líneas punteadas representan el error estándar de cada replica.

En general los valores de APL en los sistemas se mantuvieron entre 0.60 a 0.70  $\text{nm}^2$  los cuales son valores que se encuentran dentro los reportados mediante experimentos “*in vitro*” (6.0 - 6.9  $\text{nm}^2$ ). Por otro lado, el APL de manera localizada indica que las variantes generaron desplazaron a los fosfolípidos generando espacios de lípidos agrupados en los alrededores de donde los péptidos se insertaron como se puede observar en la Figura 22, donde se representa el cambio del APL durante los últimos 100 ns de cada sistema. Las variaciones del APL se representan mediante un gradiente de color “RGB” donde el color azul representa el mayor valor de APL y el color rojo el menor, por lo que las zonas donde existe una inserción de los péptidos se presentó el mayor desplazamiento de lípidos.



**Figura 22.** Análisis de APL localizado. El cambio de APL se representa en un gradiente de color “RGB” donde el color rojo representa el valor más alto de APL  $\text{\AA}^2$  y en azul el menor. Las representaciones se obtuvieron mediante la herramienta “APL” del programa *g\_lomepro*. Se utilizó un valor de “bin” de 100 en el eje “X” y 100 en el eje “Y”

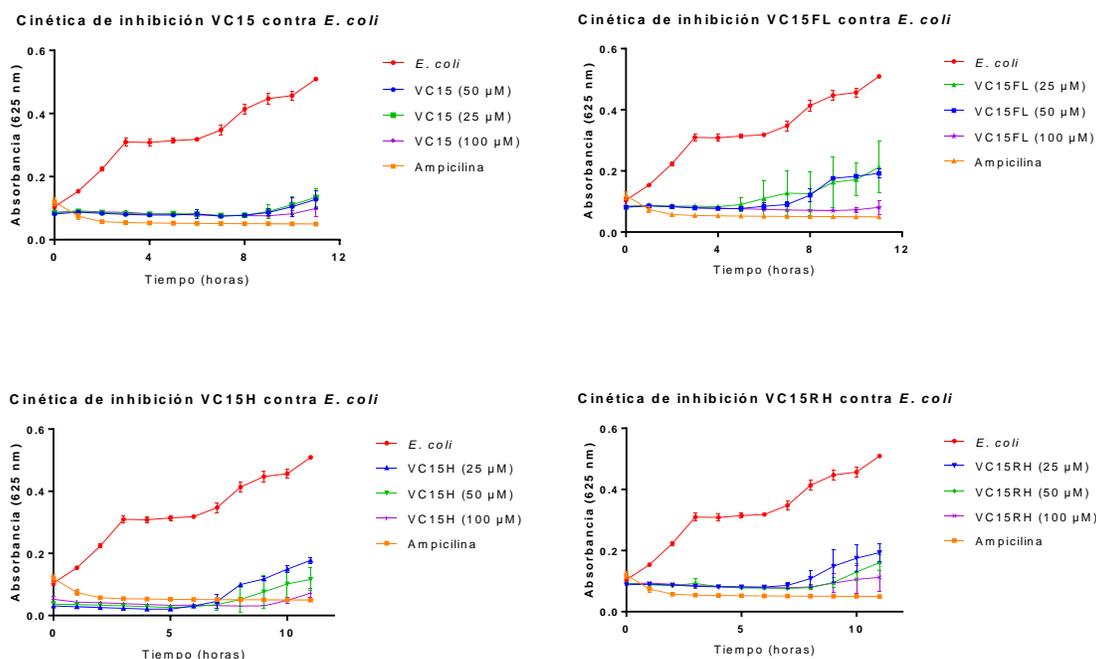
La mayor disminución de APL se observó los sistemas VC15FL, VC15HK y VC15RH donde los valores máximos fueron de 67.1, 66.1 y 66.67 Å<sup>2</sup> respectivamente y los menores fueron de 24.4, 24.2, y 24.4 Å<sup>2</sup> respectivamente. Se observó un claro desplazamiento del 71 % de los lípidos en la interacción del péptido VC15RH y VC15FL y alrededor un aumento en el APL lo cual podría indicar un aumento en la tensión superficial y la disminución de la flexibilidad de la membrana que es un indicador de la deformación de esta, también esto se puede relacionar con la formación de cavidades pudiendo ocasionar que moléculas de agua comiencen a transitar los espacios generados por el péptido (Li *et al.*, 2017). Este mecanismo se ha observado en péptidos como LL-37 que se une parcialmente al lípido A de bacterias Gram- y a su vez ocasiona un aumento en el APL (Ciumac *et al.*, 2019).

### **8.6 Evaluación de actividad antimicrobiana y hemolítica**

Se obtuvieron mediante síntesis química de la empresa GenScript las variantes VC15FL, VC15H y VC15RH y el parental VC15, sin embargo, se recibieron con un error de síntesis que derivó en el cambio del residuo de F1, F2, F3, F1 respectivamente por un ácido glutámico (E), no obstante se decidió llevar a cabo la evaluación de estos para en posteriores trabajos comparar la actividad de los péptidos sin esta modificación y relacionar el residuo F1 con la actividad que presenten entre ambos péptidos debido a que en reportes anteriores sobre el mecanismo de acción de Pin2 (Bolom *et al.*, 2019) y como se observó anteriormente en los estudios de dinámica molecular, este residuo forma parte de las primeras interacciones péptido-membrana de las variantes, Pin2 Y VC15 lo cual abre la pregunta: ¿Qué tan importante puede ser el residuo de F en relación actividad-citotoxicidad sobre VC15, VC15FL, VC15H y VC15RH?.

Para la evaluación antimicrobiana, se emplearon las bacterias *A. baumannii* y *E. coli*, patógenos Gram- de importancia clínica según la OMS debido a que ha aumentado la resistencia a antibióticos de última generación por parte de estas bacterias y se encuentran listadas en el grupo de patógenos de importancia crítica para generar nuevos antibióticos para el tratamiento de enfermedades causadas por estas (OMS, 2017). A pesar del cambio realizado en la F de las variantes

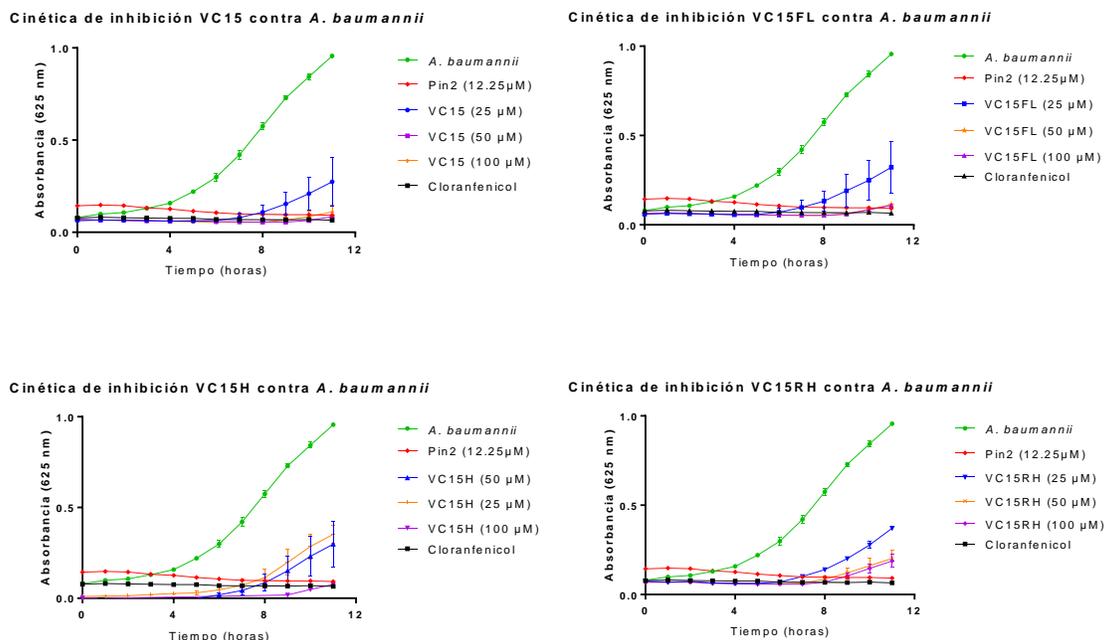
sintetizadas, la actividad antimicrobiana se logró observar en VC15 (E), VC15FL (E), VC15H (E) y VC15RH (E) contra ambas cepas (Figura 25). Frente a *E. coli* las variantes presentaron una MCI de 100  $\mu\text{M}$ , sin embargo, VC15 presentó efecto bacteriostático en 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  con un control de crecimiento de 9 horas en 25 y 50  $\mu\text{M}$ , y de 10 horas en 100  $\mu\text{M}$ , este resultado coincide con lo reportado del péptido VC15 (González *et al.*, 2021), lo cual indica que a pesar de este cambio, la actividad de este péptido no cambió respecto a la mutación de F1, sin embargo en la concentración de 100  $\mu\text{M}$  no se ha caracterizado la actividad de VC15 lo cual podría cambiar con respecto a la de VC15 (E). En las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$  de los péptidos VC15FL, VC15H y VC15RH (E) se presentó actividad bacteriostática con controles de crecimiento de hasta 9 horas (Figura 23).



**Figura 23.** Cinéticas de inhibición de los péptidos estudiados. Como control positivo de inhibición se empleó Ampicilina 25mg/ml y como control negativo de inhibición se siguió la curva de crecimiento normal de *E. coli*.

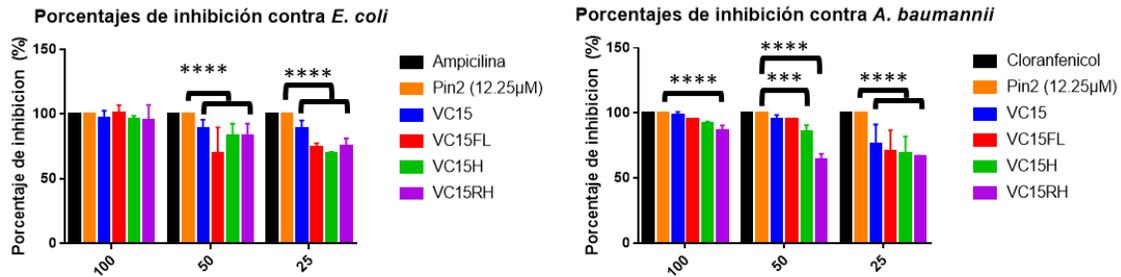
Por otra parte, la bacteria *A. baumannii* (ATCC 17802) fue más sensible a la actividad de los péptidos VC15 (E) y VC15FL (E) que presentaron CMIs de 50  $\mu\text{M}$ , no obstante, los péptidos VC15H (E) y VC15RH (E) presentaron actividad bacteriostática en las tres concentraciones empleadas. VC15H controló el crecimiento de esta bacteria durante 6 horas en las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$ ,

mientras que en 100  $\mu\text{M}$  su efecto duró 9 horas (Figura 24). Por otro lado, VC15RH controló el crecimiento durante 7 horas en la concentración de 25  $\mu\text{M}$  y 9 horas en las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  (Figura 24).



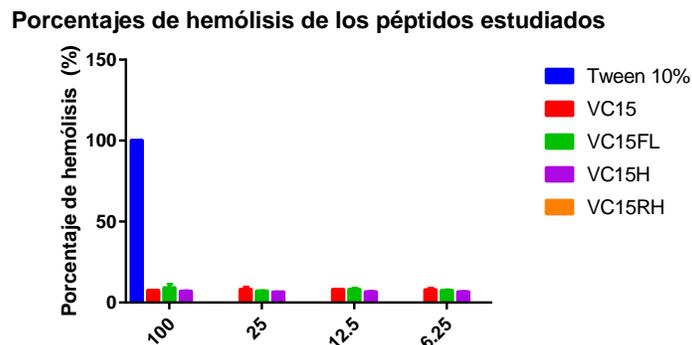
**Figura 24.** Cinéticas de inhibición de los péptidos estudiados. Como control positivo de inhibición se empleó Cloranfenicol 25mg/ml y como control negativo de inhibición se siguió la curva de crecimiento normal de *A. baumannii*.

Notablemente, los péptidos evaluados fueron efectivos frente a *A. baumannii* que, como se mencionó anteriormente, es un patógeno de importancia clínica. Con fines comparativos, en este experimento se utilizó el péptido Pin2 como control, también debido a que no se ha reportado MCI frente a este patógeno anteriormente. Los porcentajes de inhibición reportados en la figura 25 demuestran que Pin2 es efectivo a la concentración de 12.5  $\mu\text{M}$  mientras que las variantes pierden efectividad conforme se disminuye esta. La concentración-dependencia se ha reportado anteriormente en diversos PAMs como Pin2, Pin2 [GVG], VC15 y Magainina (Matzuzaki *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2016; González *et al.*, 2021). Debido a este factor, se analizaron las diferencias estadísticas entre los péptidos evaluados y el control Pin2 mediante una prueba T-test con un intervalo de confianza del 90% ( $P > 0.05$ ) que fue realizado mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 7.



**Figura 25.** Porcentajes de inhibición de los péptidos evaluados. La diferencia estadísticamente significativa se realizó comparando al porcentaje de inhibición del péptido Pin2 ( $P < 0.05$ )

La actividad de estos péptidos coincide con lo reportado sobre el péptido E11K4K10, que fue desarrollado mediante una estrategia llamada “exploración de ácido glutámico” donde cambios puntuales y la inserción de E11 provocó el aumento de la actividad antimicrobiana en comparación al parental Temporin-PE en concentraciones de 8 μM frente a *E. coli* 25922. Este cambio en E11K4K10 provocó también una disminución en la actividad hemolítica ya que no se presentó hemólisis en concentraciones de hasta 64 μM que en comparación con el parental Temporin-PE fue de 3 veces menos debido a que Temporin-PE presenta porcentajes de 20 % de hemólisis a concentraciones de 16 μM. Esto fue observado de igual forma en la evaluación de hemólisis realizada con las variantes y el parental VC15 donde no se observaron porcentajes de hemólisis por encima del 9 % y en el caso de las variantes VC15RH no se observó porcentaje de hemólisis en hasta 100 μM (Figura 26).



**Figura 26.** Ensayo de actividad hemolítica de péptidos evaluados. Como control positivo de hemólisis se empleó Tween20 al 10% y como control negativo se utilizó buffer PBS pH 7.4.

## 9. CONCLUSIONES

- Se generaron 38 variantes del péptido VC15 utilizando dos estrategias diferentes y fueron escogidas las mejores 4 variantes con base a: la energía de interacción, profundidad de penetración y la predicción de actividades deseadas como la antibacteriana y las no deseadas como la hemolítica.
- La predicción de estructura secundaria de péptidos VC15FL, VC15H, VC15HK y VC15RH indicó que estos péptidos son alfa hélices.
- Las variantes VC15FL, VC15H, VC15HK y VC15RH presentaron valores de energía de unión al modelo de membrana lipídica Gram- fue de -14.7, -10.1, -10.4 y -10.9 respectivamente y que son similares a los del péptido VC15 y también similares a los de péptidos caracterizados experimentalmente lo que indica la probable actividad antibacteriana frente a bacterias tanto Gram+ como Gram-.
- Los estudios de dinámica molecular en un modelo de membrana bacteriana POPC/POPG indicó que las variantes VC15FL y VC15H se unen rápidamente a la membrana.
- Todos los péptidos se insertan lateralmente a la membrana y son estables dentro de esta.
- Los péptidos VC15FL y VC15HK se insertan parcialmente de los aminoácidos 1 al 14 en la membrana lipídica mientras que los péptidos VC15RH y VC15H se insertan completamente.
- Los análisis de APL y grosor indicaron que la membrana sufre cambios físicos ocasionados por la inserción de los péptidos VC15RH y VC15FL lo cual indica que pudieran generar daños a la membrana de bacterias Gram-, sin embargo, esto se tiene que confirmar experimentalmente.
- Los péptidos VC15 (E), VC15FL (E), VC15H (E) y VC15RH (E), a pesar del cambio de fenilalanina a ácido glutámico, presentaron actividad frente a las cepas *E. coli* y *A. baumannii*.
- La concentración mínima inhibitoria de VC15FL (E), VC15H (E) y VC15RH (E) fue de 100  $\mu$ M, mientras que VC15 (E) presento actividad bacteriostática en esta concentración.

- La bacteria *A. baumannii* fue más susceptible a la actividad de los péptidos VC15 (E), VC15FL (E) que presentaron una concentración mínima inhibitoria de 50  $\mu$ M, mientras que VC15H y VC15RH presentaron una actividad bactericida en la mayor concentración evaluada (100  $\mu$ M).
- Los porcentajes de hemólisis presentados por estos péptidos no fueron mayores al 9 % y en el caso de VC15RH (E) no se observó hemólisis en ninguna concentración evaluada lo cual coloca a estos péptidos como posibles agentes terapéuticos.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar las diferencias entre la interacción de los péptidos diseñados con modelos de membrana de Eucariota y levaduras.
- Sintetizar los péptidos y caracterizar su mecanismo de acción en membranas modeladas “*in vitro*” mediante técnicas biofísicas.
- Determinar la estructura secundaria mediante dicroísmo circular.
- Sintetizar los péptidos diseñados y probarlos mediante análisis de susceptibilidad frente a bacterias ATCC y patógenas de interés clínico.
- Determinar la actividad hemolítica.
- Determinar la actividad anticancerígena.
- Determinar la actividad frente a levaduras.
- Caracterizar la actividad frente a virus.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25.
- Acebes, S., Fernandez-Fueyo, E., Monza, E., Lucas, M. F., Almendral, D., Ruiz-Dueñas, F. J., ... & Guallar, V. (2016). Rational enzyme engineering through biophysical and biochemical modeling. *ACS Catalysis*, 6(3), 1624-1629.
- Adedeji, W. A. (2016). The treasure called antibiotics. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 14(2), 56.
- Adzitey, F. (2015). Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review.
- Aedo S, Ivanova L, Tomova A, Cabello FC. Plasmid-related quinolone resistance determinants in epidemic *Vibrio parahaemolyticus*, uropathogenic *Escherichia coli*, and marine bacteria from an aquaculture area in Chile. *Microb Ecol* 2014; 68: 324–28.
- Ahmed, A., Azim, A., Gurjar, M., & Baronia, A. K. (2014). Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 18(5), 310.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
- Alcántar-Curiel, M. D., Fernández-Vázquez, J. L., Toledano-Tableros, J. E., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., López-Álvarez, M. D. R., ... & Santos-Preciado, J. I. (2019). Emergence of IncFIA Plasmid-Carrying bla NDM-1 Among *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates in a Tertiary Referral Hospital in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 830-838.

- Alexander, T. W., Yanke, L. J., Topp, E., Olson, M. E., Read, R. R., Morck, D. W., & McAllister, T. A. (2008). Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4405-4416.
- Amábile-Cuevas, C. F. (2021). Antibiotic usage and resistance in Mexico: an update after a decade of change. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15(04), 442-449.
- Ambi, S., Basu, N., & Visweswariah, S. S. (2010). cAMP-regulated protein lysine acetylases in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24313-24323.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134.
- Arasteh, S., & Bagheri, M. (2017). Molecular Dynamics Simulation and Analysis of the Antimicrobial Peptide–Lipid Bilayer Interactions. *In Antimicrobial Peptides* (pp. 103-118). Humana Press, New York, NY.
- Arriola-Peñalosa, M. A. (2015). The role of health regulations in the rational use of medicines. *Gaceta medica de Mexico*, 151(5), 690-698.
- Ashkar, R., Nagao, M., Butler, P. D., Woodka, A. C., Sen, M. K., & Koga, T. (2015). Tuning membrane thickness fluctuations in model lipid bilayers. *Biophysical journal*, 109(1), 106-112.
- Auta, A., Hadi, M. A., Oga, E., Adewuyi, E. O., Abdu-Aguye, S. N., Adeloye, D., ... & Morgan, D. J. (2019). Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 78(1), 8-18.
- Béahdy, J. (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Advances in applied microbiology*, 18, 309-406.
- Bechinger, B., & Salnikow, E. S. (2012). The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids*, 165(3), 282-301.

- Berglund, N. A., Piggot, T. J., Jefferies, D., Sessions, R. B., Bond, P. J., & Khalid, S. (2015). Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1 with both membranes of *E. coli*: a molecular dynamics study. *PLoS computational biology*, 11(4), e1004180.
- 
- Beyth, N., Hourihaddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Biju, R. A., Thomas, J. M., Thomas, L. M., Koshy, S. L., & Binu, S. (2020). The study on prescription pattern of antibiotics in various departments of a tertiary care hospital.
- Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ (2014) Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9: 1165–1177.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, et al. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13: 42–51.
- Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism, and recent applications. *Protein and peptide letters*, 27(1), 4-16.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185-194.
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* 4:187–217
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7047.

- Burch DGS. Antimicrobial drug use in swine. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5th ed.* Ames (IA): Blackwell Publishing; 2013:553–568
- Cardoso, M. H., Orozco, R. Q., Rezende, S. B., Rodrigues, G., Oshiro, K. G., Cândido, E. S., & Franco, O. L. (2020). Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates?. *Frontiers in microbiology, 10*, 3097.
- Carugo, O., & Pongor, S. (2001). A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein science, 10*(7), 1470-1473
- Chandra Sekar, P., Chandrasekhar, G., & Rajasekaran, R. (2021). Hydrophobic Residues Confer the Helicity and Membrane Permeability of Ocellatin-1 Antimicrobial Peptide Scaffold Towards Therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 27*(4), 2459-2470.
- Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., ... & Raghava, G. P. (2016). A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Scientific reports, 6*(1), 1-13.
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 51*(4), 1398-1406.
- Christensen, H., Martin, M. T., & Waley, S. G. (1990). Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl[1]enzyme mechanism. *Biochemical Journal, 266*(3), 853
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science, 537*, 163-185.
- Clark CR. Antimicrobial drug use in sheep and goats. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5th ed.* Ames (IA): Blackwell Publishing; 2013:529–539

- Collignon, P., Athukorala, P. C., Senanayake, S., & Khan, F. (2015). Antimicrobial resistance: the major contribution of poor governance and corruption to this growing problem. *PloS one*, *10*(3), e0116746.
- Corrêa, J. A. F., Evangelista, A. G., de Melo Nazareth, T., & Luciano, F. B. (2019). Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia*, *8*, 100494.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*, *359*(1), 35-45.
- Daniel V., Uday K., Amarda S. (2018) Deep Learning Improves Antimicrobial Peptide Recognition. *Bioinformatics*, *34*(16):2740-2747
- Dathe, M., T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. L. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann, and M. Bienert.1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and hemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* *403*:208-212.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of molecular modeling*, *20*(6), 1-6.
- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*, *7*(3), 66.
- Dubos, R. J. (1939). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of experimental medicine*, *70*(1), 1.
- Dutta, S. R., Gauri, S. S., Ghosh, T., Halder, S. K., DasMohapatra, P. K., Mondal, K. C., & Ghosh, A. K. (2017). Elucidation of structural and functional integration of a novel antimicrobial peptide from *Antheraea mylitta*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *27*(8), 1686-1692.
- Epanand, R. M., & Epanand, R. F. (2011). Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, *17*(5), 298-305.

- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, 4(2016), 90-101.
- Faizi, H. A., Frey, S. L., Steinkühler, J., Dimova, R., & Vlahovska, P. M. (2019). Bending rigidity of charged lipid bilayer membranes. *Soft Matter*, 15(29), 6006-6013.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B., & Hancock, R. E. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1-21.
- Fjell, C. D., Hancock, R. E., & Cherkasov, A. (2007). AMPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*, 23(9), 1148-1155.
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function (vol 11, pg 37, 2012). *Nature reviews drug discovery*, 11(2), 124-124.
- Gapsys, V., de Groot, B. L., & Briones, R. (2013). Computational analysis of local membrane properties. *Journal of computer-aided molecular design*, 27, 845-858.
- Garza-González, E., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., ... & Camacho-Ortiz, A. (2020). The evolution of antimicrobial resistance in Mexico during the last decade: results from the INVIFAR group. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1372-1382.
- Gelband, H., Molly Miller, P., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., ... & Laxminarayan, R. (2015). The state of the world's antibiotics 2015. *Wound healing southern africa*, 8(2), 30-34.
- Gelpi, J. (2015). Hospital A, Goñi R, Orozco M. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 8, 37-47.

- Giguère S. Antimicrobial drug action and interaction. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5th ed.* Ames (IA): Blackwell Publishing; 2013:1–10.
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1-33.
- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365(9459): 579–587.
- Gor, M. C., Vezina, B., McMahon, R. M., King, G. J., Panjikar, S., Rehm, B. H., ... & Smith, A. T. (2020). Crystal structure and site-directed mutagenesis of circular bacteriocin plantacyclin B21AG reveals cationic and aromatic residues important for antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16.
- Gross, M. (2013). Antibiotics in crisis. *Current Biology*, 23(24), R1063-R1065.
- Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Open Source Drug Discovery Consortium, et al. (2013) In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE* 8(9): e73957
- Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 97(16), 8856-8861.
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105-110
- Henderson, J. M., Waring, A. J., Separovic, F., & Lee, K. Y. C. (2016). Antimicrobial peptides share a common interaction driven by membrane line tension reduction. *Biophysical journal*, 111(10), 2176-2189.
- Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis.* 2009;49(8):1248–1253.

- Hofacre CL, Fricke JA, Inglis T. Antimicrobial drug use in poultry. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th ed. Ames (IA): *Blackwell Publishing*; 2013:569–587.
- Hollmann, A., Martínez, M., Noguera, M. E., Augusto, M. T., Disalvo, A., Santos, N. C., ... & Maffía, P. C. (2016). Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *141*, 528-536.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, *387*(10014), 176-187.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, *11*, 2559.
- Huang, H. W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1758*(9), 1292-1302.
- Huang, H. W., & Charron, N. E. (2017). Understanding membrane-active antimicrobial peptides. *Quarterly reviews of biophysics*, *50*, e10.
- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., De Groot, B. L., ... & MacKerell Jr, A. D. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature methods*, *14*(1), 71-73.
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*, *1*(2), 143-152.
- Isaías-Camacho, J. O., Salinas-Lezama, E., Rodríguez-Weber, F. L., & Díaz-Greene, E. (2018). Prescripción racional de antibióticos: una conducta urgente. *Medicina interna de México*, *34*(5), 762-770.
- Jean-François, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M. H., & Dufourc, E. J. (2008). Aggregation of cateslytin  $\beta$ -sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new

mode of action for antimicrobial peptides?. *Biochemistry*, 47(24), 6394-6402.

- Kazmierczak, K. M., Lob, S. H., Hoban, D. J., Hackel, M. A., Badal, R. E., & Bouchillon, S. K. (2015). Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in intra-abdominal infection isolates in Latin America, 2008–2012. Results of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 82(3), 209-214.
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., ... & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3463-E3470.
- Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF (2013) Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Int J Bacteriol*
- Lai, P. K., & Kaznessis, Y. N. (2018). Insights into membrane translocation of protegrin antimicrobial peptides by multistep molecular dynamics simulations. *ACS omega*, 3(6), 6056-6065.
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic acids research*, 44(W1), W449-W454.
- Latz, S., Wahida, A., Arif, A., Häfner, H., Hoß, M., Ritter, K., & Horz, H. P. (2016). Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria. *Journal of basic microbiology*, 56(10), 1117-1123.
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical infectious diseases*, 34(4), 482-492.

- Lee, E., Kim, J. K., Jeon, D., Jeong, K. W., Shin, A., & Kim, Y. (2015). Functional roles of aromatic residues and helices of papiliocin in its antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Scientific reports*, 5(1), 1-17.
- Lee, J. Y., Park, Y. K., Chung, E. S., Na, I. Y., & Ko, K. S. (2016). Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Lee, JH. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *J Microbiol.* 57, 181–184 (2019).
- Lee, K. H. (2002). Development of short antimicrobial peptides derived from host defense peptides or by combinatorial libraries. *Current pharmaceutical design*, 8(9), 795-813.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11, 73.
- Li, L. B., Vorobyov, I., & Allen, T. W. (2012). The role of membrane thickness in charged protein–lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(2), 135-145.
- Lim, M. P., Firdaus-Raih, M., & Nathan, S. (2016). Nematode peptides with host-directed anti-inflammatory activity rescue *Caenorhabditis elegans* from a *Burkholderia pseudomallei* infection. *Frontiers in microbiology*, 7, 1436.
- Lipkin, R. B., & Lazaridis, T. (2015). Implicit membrane investigation of the stability of antimicrobial peptide  $\beta$ -barrels and arcs. *The Journal of membrane biology*, 248(3), 469-486.
- Liu, S., Fan, L., Sun, J., Lao, X., & Zheng, H. (2017). Computational resources and tools for antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*, 23(1), 4-12.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.

- Lohner, K., & Prossnigg, F. (2009). Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1656-1666.
- Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., & Mosberg, H. I. (2011). Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *Journal of chemical information and modeling*, 51(4), 930-946.
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic acids research*, 40(D1), D370-D376.
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., ... & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*.
- Madhongsu, K., Pasan, S., Phophetleb, O., Nasompag, S., Thammasirirak, S., Daduang, S., ... & Patramanon, R. (2013). Antimicrobial action of the cyclic peptide bactenecin on *Burkholderia pseudomallei* correlates with efficient membrane permeabilization. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6), e2267.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2006). Brock biology of microorganisms. 11. internat. Ed. Englewood Cliiffs: Prentice Hall.
- Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., & Bjorn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 194.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (2014) Antimicrobial agent mechanisms of action and resistance, *In: Textbook of Diagnostic Microbiology*, St. Louis: Saunders, 254–273
- Mai, B., Gao, Y., Li, M., Wang, X., Zhang, K., Liu, Q., ... & Wang, P. (2017). Photodynamic antimicrobial chemotherapy for *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant bacterial burn infection in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, 12, 5915.

- Maron, D. F., Smith, T. J., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and health*, 9(1), 1-11.
- Marquette, A., & Bechinger, B. (2018). Biophysical investigations elucidating the mechanisms of action of antimicrobial peptides and their synergism. *Biomolecules*, 8(2), 18.
- Marshall, S. A., Lazar, G. A., Chirino, A. J., & Desjarlais, J. R. (2003). Rational design and engineering of therapeutic proteins. *Drug discovery today*, 8(5), 212-221.
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*, 316(11), 1193.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1995). Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*, 34(19), 6521-6526.
- McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical infectious diseases*, 34(Supplement\_3), S93-S106.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 443-465.
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V. and Rao, A. R. (2017). Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Mejía-Argueta, E. L., Santillán-Benítez, J. G., & Ortiz-Reynoso, M. (2020). Antimicrobial peptides, an alternative to combat bacterial resistance. *Acta Biológica Colombiana*, 25(2), 294-302.
- Miranda-Novales, M. G., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Álvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J. L., & Ponce de León-Rosales, S. (2022). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *salud pública de méxico*, 62, 42-49.

- Misawa, T., Goto, C., Shibata, N., Hirano, M., Kikuchi, Y., Naito, M., & Demizu, Y. (2019). Rational design of novel amphipathic antimicrobial peptides focused on the distribution of cationic amino acid residues. *MedChemComm*, 10(6), 896-900.
- Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS One* 2012; 7:e45012.
- Morales-Martínez, A., Bertrand, B., Hernández-Meza, J. M., Garduño-Juárez, R., Silva-Sanchez, J., & Muñoz-Garay, C. (2022). Effect of membrane lipid fluidity, composition, and charge on the ability of the antimicrobial peptide ascaphin-8 to insert into the membrane and form pores. *Biophysical Journal*, S0006-3495.
- Munita, J. M., Arias, C. A., Unit, A. R., & Santiago, A. (2016). HHS public access mechanisms of antibiotic resistance. *HHS Public Access*, 4(2), 1-37.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, 59(3), 181-196.
- Normas CLSI. (2015). Normas de garantía de calidad del Instituto de Estándares de laboratorios clínicos. Clinical Laboratory Standarts Institute.
- Omardien, S., Drijfhout, J. W., Vaz, F. M., Wenzel, M., Hamoen, L. W., Zaat, S. A., & Brul, S. (2018). Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(11), 2404-2415.
- Organización Mundial de la Salud. (2004). The world medicines situation. Suiza: World Health Organization.
- Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., & Torres, R. (2015). Peptides: A package for data mining of antimicrobial peptides. *Small*, 12, 44-444.
- Otazo-Pérez, A., Asensio-Calavia, P., González-Acosta, S., Baca-González, V., López, M. R., Morales-delaNuez, A., & Pérez de la Lastra, J.

- M. (2022). Antimicrobial activity of cathelicidin-derived peptide from the Iberian mole *Talpa occidentalis*. *Vaccines*, 10(7), 1105.
- Page, M. I. (Ed.). (2012). The chemistry of  $\beta$ -lactams. *Springer Science & Business Media*.
  - Pan American Health Organization. Extent and trends in antimicrobial resistance in Latin America. *RELAVRA*, 2014, 2015, 2016. (in press).
  - Peng, J., Qiu, S., Jia, F., Zhang, L., He, Y., Zhang, F., ... & Wang, K. (2021). The introduction of l-phenylalanine into antimicrobial peptide protonectin enhances the selective antibacterial activity of its derivative phe-Prt against Gram-positive bacteria. *Amino Acids*, 53(1), 23-32.
  - Perrin, B. S., & Pastor, R. W. (2016). Simulations of membrane-disrupting peptides I: alamethicin pore stability and spontaneous insertion. *Biophysical Journal*, 111(6), 1248-1257.
  - Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in pharmacology*, 9, 281.
  - Piggot, T. J., Holdbrook, D. A., & Khalid, S. (2011). Electroporation of the E. coli and S. aureus membranes: molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes. *The journal of physical chemistry B*, 115(45), 13381-13388.
  - Pistolesi, S., Pogni, R., & Feix, J. B. (2007). Membrane insertion and bilayer perturbation by antimicrobial peptide CM15. *Biophysical journal*, 93(5), 1651-1660.
  - Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol* 2012; 3: 24.
  - Poluri, K. M., & Gulati, K. (2017). Rational Designing of Novel Proteins Through Computational Approaches. In *Protein Engineering Techniques* (pp. 61-83). Springer, Singapore.
  - Primo, M. G. B., Guilarde, A. O., Martelli, C. M. T., Batista, L. J. D. A., & Turchi, M. D. (2012). Healthcare-associated *Staphylococcus aureus*

bloodstream infection: length of stay, attributable mortality, and additional direct costs. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 503-509.

- Qayyum, S., Oves, M., & Khan, A. U. (2017). Obliteration of bacterial growth and biofilm through ROS generation by facilely synthesized green silver nanoparticles. *PLoS one*, 12(8), e0181363.
- Ramesh, S., Govender, T., Kruger, H. G., de la Torre, B. G., & Albericio, F. (2016). Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science*, 22(7), 438-451.
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., ... & Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiological research*, 191, 51-80.
- Roberts, S. C., & Zembower, T. R. (2021). Global increases in antibiotic consumption: a concerning trend for WHO targets. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(1), 10-11.
- Rodríguez Solís A. J. (2012). Comparación biológica y estructural entre antibióticos peptídicos tipo alfa lineales y beta defensinas (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Rosales-Reyes, R., Rodríguez-Alvarado, M., Lezana-Fernández, J. L., Sánchez-Lozano, J. Y., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., ... & Santos-Preciado, J. I. (2020). Pseudomonas aeruginosa isolates from a cohort of Mexican children with cystic fibrosis show adaptation to a chronic phenotype. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 39(10), 899-906.
- Salimiyan Rizi, K. K., & Noghondar, M. (2018). Adaptive antibiotic resistance: Overview and perspectives. *J. Infect. Dis. Ther*, 6, 1-3.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, et al. (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28: 519–542
- Selsted, M. E., Miller, S. I., Henschen, A. H., & Ouellette, A. J. (1992). Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *The Journal of cell biology*, 118(4), 929-936.

- Shai, Y., & Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629-1641.
- Spencer, J. D., Hains, D. S., Porter, E., Bevins, C. L., DiRosario, J., Becknell, B., ... & Schwaderer, A. L. (2012). Human alpha defensin 5 expression in the human kidney and urinary tract. *PloS one*, 7(2), e31712.
- Stokstad, E., & Jukes, T. H. (1950). Further observations on the “animal protein factor”. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine*, 73(3), 523-528.
- Tankrathok, A., Punpad, A., Kongchaiyapoom, M., Sosiangdi, S., Jangpromma, N., Daduang, S., & Klaynongsruang, S. (2019). Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(2), 142-152.
- Tiwari, M. K., Singh, R., Singh, R. K., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2012). Computational approaches for rational design of proteins with novel functionalities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201204002.
- Torres-González P, Bobadilla-Del Valle M, Tovar-Calderón E, Leal-Vega F, Hernández-Cruz A, Martínez-Gamboa A, Niembro-Ortega MD, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-León A (2015) Outbreak caused by Enterobacteriaceae harboring NDM-1 metallo-β-lactamase carried in an IncFII plasmid in a tertiary care hospital in Mexico City. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 7080-7083
- Tsai, C. W., Hsu, N. Y., Wang, C. H., Lu, C. Y., Chang, Y., Tsai, H. H. G., & Ruaan, R. C. (2009). Coupling molecular dynamics simulations with experiments for the rational design of indolicidin-analogous antimicrobial peptides. *Journal of molecular biology*, 392(3), 837-854.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., & Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(9), 2206-2214.

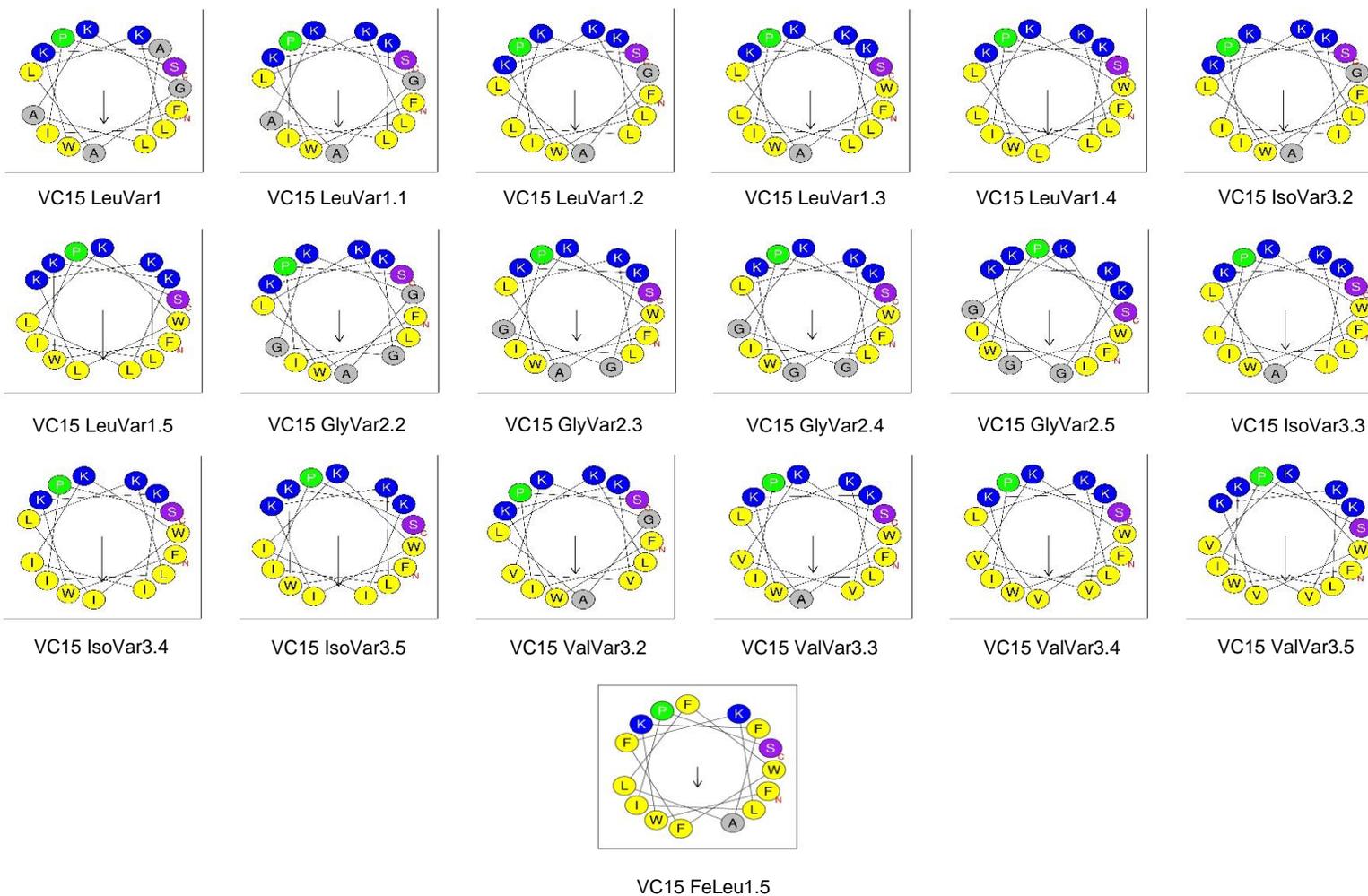
- US Department of Agriculture. Part III: Health Management and Biosecurity in US Feedlots, 1999. US Department of Agriculture; 2000. Available from: [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot99/Feedlot99\\_dr\\_PartIII.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot99/Feedlot99_dr_PartIII.pdf). Accessed December 15, 2014.
- Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 203.
- Vazquez-Grande, G., & Kumar, A. (2015, February). Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock: focus on antibiotic combination therapy. In *Seminars in respiratory and critical care medicine* (Vol. 36, No. 01, pp. 154-166). *Thieme Medical Publishers*.
- Vishweshwaraiah, Y. L., Acharya, A., Hegde, V., & Prakash, B. (2021). Rational design of hyperstable *antibacterial peptides for food preservation*. *NPJ science of food*, 5(1), 26.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15(1), 40-56.
- Wang, G., Hanke, M. L., Mishra, B., Lushnikova, T., Heim, C. E., Chittezhom Thomas, V., ... & Kielian, T. (2014). Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds. *ACS chemical biology*, 9(9), 1997-2002.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* 44, D1087-D1093
- Wang, G., Li, X., & Zasloff, M. (2010). A database view of naturally occurring antimicrobial peptides: nomenclature, classification and amino acid sequence analysis. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. *CABI, Oxfordshire, UK*, 1-21.

- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009) "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench" *Bioinformatics* 25 (9) 1189-1191
- Welschen I, Kuyvenhoven MM, Hoes AW, et al. Effectiveness of a multiple intervention to reduce antibiotic prescribing for respiratory tract symptoms in primary care: randomized controlled trial. *Br Med J* 2004; 329(7463): 431.
- World Health Organization. (2017). Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. World Health Organization Media Center. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animalseffectiveness/en>.
- World Health Organization. Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe. Copenhagen: World Health Organization; 2011. Available from: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/136454/e94889.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf). Accessed December 15, 2014.
- Xu, J., Li, F., Leier, A., Xiang, D., Shen, H. H., Marquez Lago, T. T., ... & Song, J. (2021). Comprehensive assessment of machine learning-based methods for predicting antimicrobial peptides. *Briefings in Bioinformatics*, 22(5), bbab083.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7-8.
- Yang, M. Y., Chang, K. C., Chen, L. Y., Wang, P. C., Chou, C. C., Wu, Z. B., & Hu, A. (2018). Blue light irradiation triggers the antimicrobial potential of ZnO nanoparticles on drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 235-242.
- Yang, Z., He, S., Wang, J., Yang, Y., Zhang, L., Li, Y., & Shan, A. (2019). Rational design of short peptide variants by using Kunitzin-RE, an amphibian-derived bioactivity peptide, for acquired potent broad-spectrum antimicrobial and improved therapeutic potential of commensalism coinfection of pathogens. *Journal of Medicinal Chemistry*.

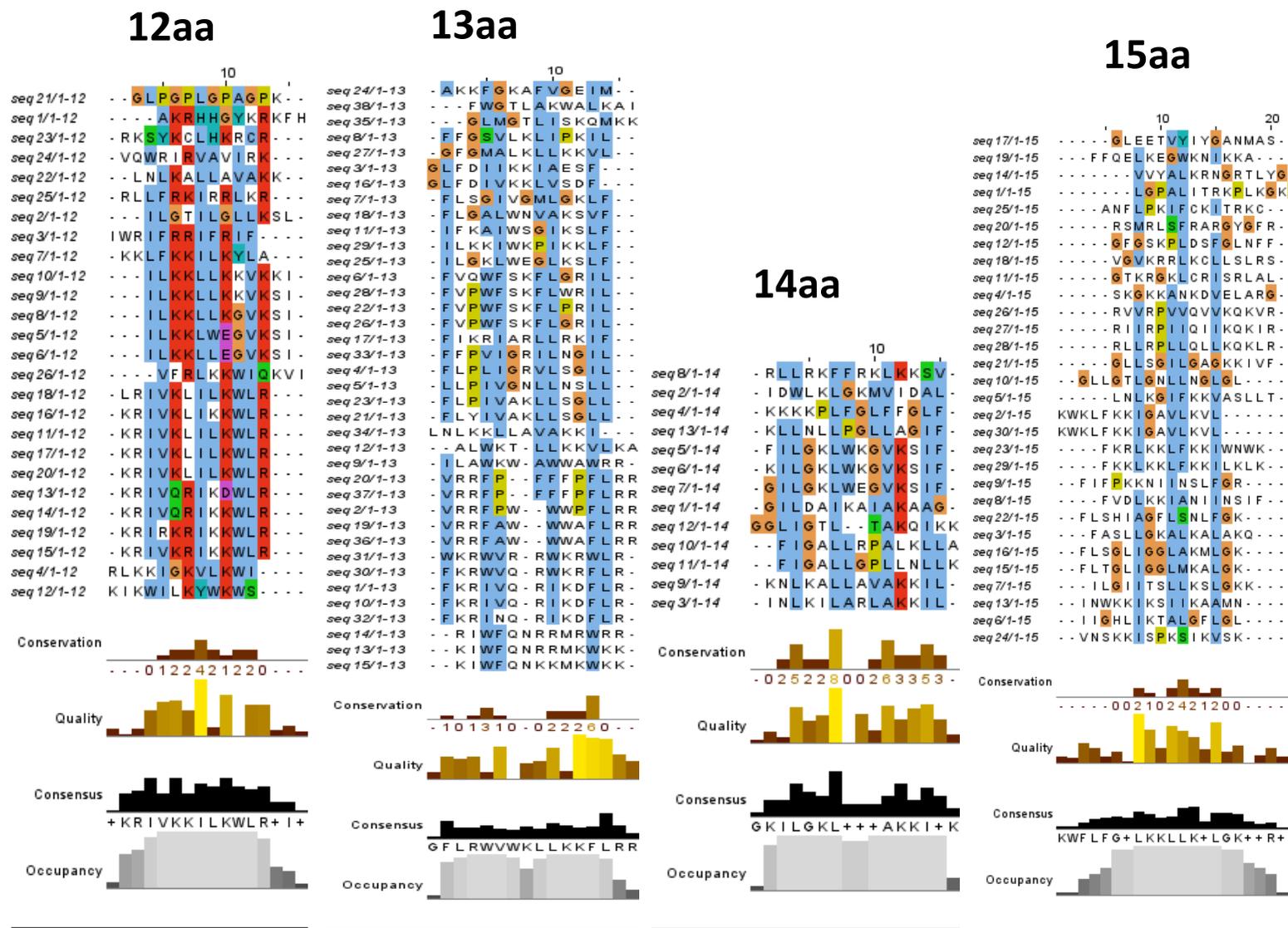
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
- Yoshida, H., Bogaki, M. A. Y. U. M. I., Nakamura, M. I. K. A., & Nakamura, S. H. I. N. I. C. H. I. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(6), 1271-1272.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 54.
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1436-1449.

## 11. ANEXOS

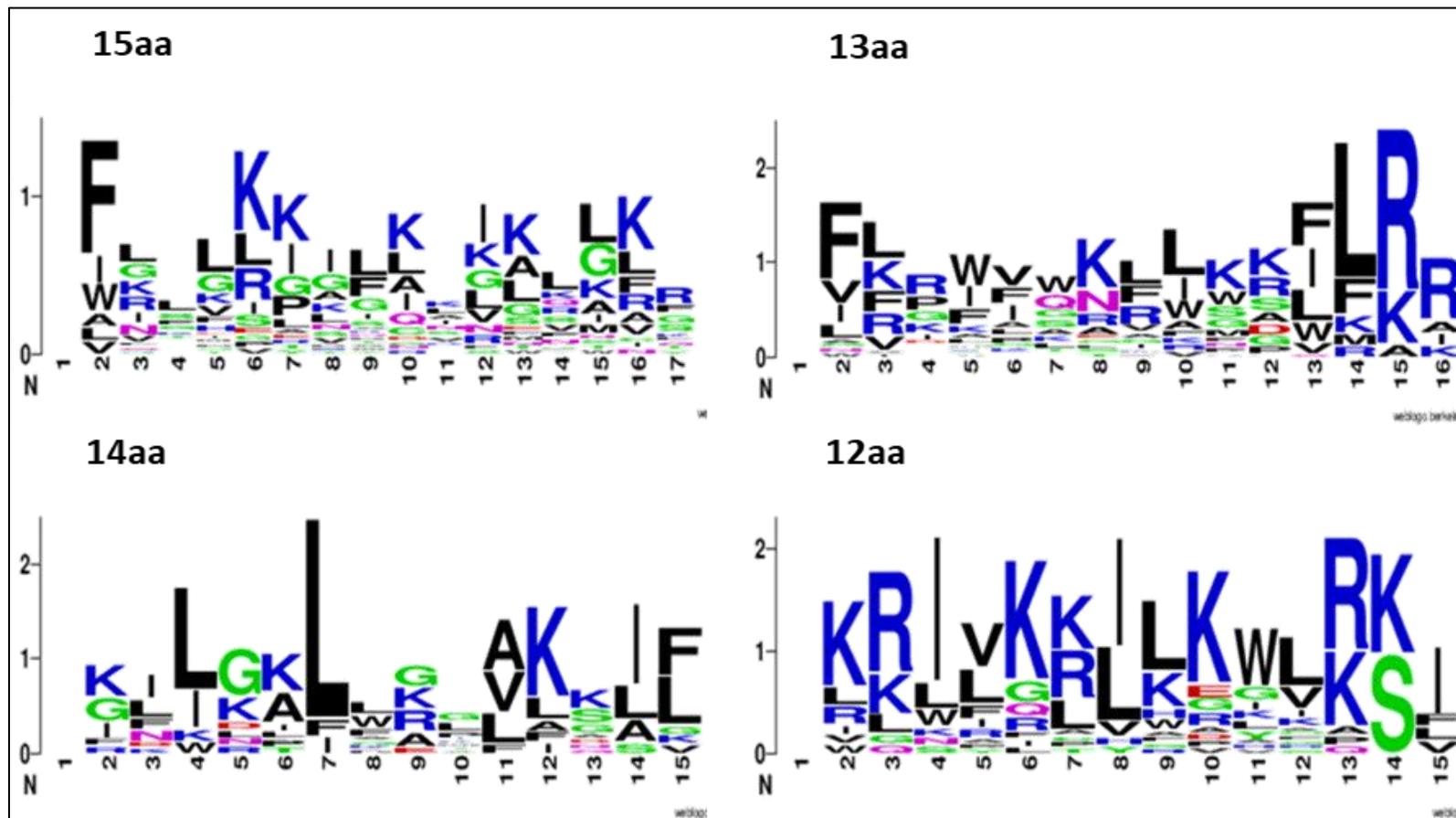
Anexo A: Variantes obtenidas mediante la modificación de la proyección helicoidal del péptido VC15.



Anexo B: alineamientos realizados utilizando las secuencias extraídas de las bases de datos DRAMP, DBAASP y APD.



ANEXO D: Graficas de aminoácidos más conservados a través de los alineamientos realizados.



### Anexo D: Datos utilizados para realizar el análisis de componentes principales

SECUENCIA	CARGA NETA	% DE RESIDUOS HIDROFOBICOS	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELECTRICO	ÍNDICE ALIFATICO	ÍNDICE DE INESTABILIDAD	ÍNDICE DE BOMAN	ÍNDICE DE HIDROFOBICIDAD	ÍNDICE DE MOMENTO HIDROFOBICO	HEMOLISIS	GRAVY (HIDROPATICIDAD)	Steric hindrance	Hydrophobicity	Amphiphilicity	Hydrophility
GLLKRIKTLL	3.00	50	1154.5049	11.823063	195	24.62	0.305	0.052	0.5856401	0.48	-0.11	0.75	0.63	0.98	-0.04
GLLKRIKTL	3.00	44	1041.3455	11.823063	173.33333	26.2444444	0.88555556	-0.06	0.5625147	0.47	-0.18	0.72	0.28	1.09	0.16
GLLKRI	2.00	50	698.9069	11.651769	195	48.5166667	0.795	-0.008333333	0.7692331	0.49	-0.15	0.72	0.55	1.02	0.1
FIFDLLKLV	1.00	70	1235.5754	9.537301	185	4.36	-0.986	0.412	0.6334622	0.49	0.12	0.82	1.44	0.73	-0.47
FLGLLGSL	0.00	66	932.1708	6.099982	216.66667	8.8888889	2.89555556	0.807777778	0.3691214	0.49	0.37	0.68	2.24	0	-1.24
FLKLLKLL	3.00	67	1115.5111	11.103081	6	-28.8444444	1.21444444	0.221111111	0.8027695	0.57	0	0.85	1.12	1.22	-0.28
RRRRRRRR	8.00	0	1267.5152	13.345085	0	509.95	14.92	-2.53	0.2653653	0.49	-1.76	0.68	-4.5	2.45	3
IWRIFRRIF	3.00	67	1306.6223	12.801075	130	72.5333333	2.41222222	-0.028888889	1.1371434	1	-0.17	0.8	0.52	1.59	-0.53
FRIRVRV	3.00	57	945.1789	12.801075	138.57143	8.5714286	4.11142857	-0.408571429	0.4199277	0.49	-0.41	0.75	0.31	1.05	0.24
KKLLKWLKLL	5.00	54	1410.8959	11.402903	177.27273	-10.5636364	0.07454545	-0.126363636	0.8154559	0.83	-0.23	0.82	-0.13	2.3	0.24
KKLFFKILKYL	5.00	45	1421.8759	11.016958	141.81818	-10.2181818	0.47545455	-0.135454545	0.8212123	0.83	-0.23	0.8	-0.19	2.13	0.27
LNLKALLAVAK	2.00	73	1153.4738	10.805394	195.45455	1.3727273	1.03727273	0.309090909	0.2787971	0.54	0.05	0.76	1.23	0.67	-0.36
ILGTILGLLKSL	1.00	58	1240.5922	9.700016	227.5	27.1166667	2.06666667	0.6075	0.4064933	0.59	0.24	0.72	1.82	0.31	-0.81
IWRIFRRIFRIF	4.00	67	1723.1458	12.977126	130	56.9	2.39416667	-0.018333333	1.1586777	1	-0.16	0.8	0.62	1.39	-0.51
RLKKIGKVLKWI	5.00	50	1481.9344	11.997387	154.16667	-26.2083333	0.84416667	-0.106666667	0.7557005	0.48	-0.21	0.74	-0.05	2	0.24
ILKKLWEGVKS	2.00	50	1413.7665	10.506902	154.16667	28.4	0.01083333	0.1525	0.696833	0.5	-0.05	0.73	0.29	1.6	0.02
ILKKLEGVKS	2.00	50	1340.7127	10.506902	186.66667	8.6666667	0.22666667	0.173333333	0.69902	0.47	-0.04	0.75	0.68	1.02	0.15
KKLFFKILKYLA	5.00	50	1492.9547	11.016958	138.33333	-8.5333333	0.285	-0.0725	0.8212123	0.62	-0.19	0.77	-0.02	1.95	0.21
ILKKLLKGVKS	4.00	50	1339.7713	11.278354	186.66667	-5.4833333	0.33166667	0.11	0.7679902	0.48	-0.08	0.75	0.65	1.22	0.15
ILKKLLKVKVKS	5.00	50	1410.8935	11.402903	186.66667	-5.4833333	0.20916667	-0.055	0.7476159	0.85	-0.18	0.81	0.36	1.53	0.4
ILKKLLKVKVKKI	6.00	50	1451.9894	11.499612	186.66667	-12.5583333	0.38833333	-0.165	0.8539455	0.89	-0.25	0.82	0.1	1.84	0.63

KRIVKILKWLR	5.00	58	1566.0553	12.54607	186.666 67	55.0916667	1.293333 33	-0.144166667	0.9564832	0.49	-0.24	0.82	0.25	1.9	0.09
KIKWILKYWKWS	4.00	50	1679.0836	10.865994	97.5	-4.65	0.3325	0.0275	0.5355699	0.49	-0.13	0.76	-0.63	3.38	-0.47
KRIVQRIKDWLR	4.00	42	1610.9692	12.24367	121.666 67	48.5166667	4.0825	-0.5525	0.9516691	0.47	-0.5	0.78	-1.02	1.91	0.66
KRIVQRIKKWLR	6.00	42	1624.0547	12.819705	121.666 67	48.5166667	3.818333 33	-0.6025	1.0046391	0.47	-0.53	0.77	-1.05	2.21	0.66
KRIVKRIKKWLR	7.00	42	1624.0981	12.825635	121.666 67	73.2833333	3.819166 67	-0.656666667	1.0578188	0.48	-0.56	0.77	-1.08	2.41	0.89
KRIVKLIKWWLR	6.00	50	1581.07	12.559571	154.166 67	39.0416667	2.165833 33	-0.3575	1.0223294	0.48	-0.37	0.79	-0.39	2.21	0.49
KRIVKLILKWLR	5.00	58	1566.0553	12.54607	186.666 67	55.0916667	1.293333 33	-0.144166667	0.9564832	0.48	-0.24	0.82	0.25	1.9	0.09
LRIVKLILKWLR	4.00	67	1551.0406	12.531746	219.166 67	43.975	0.420833 33	0.069166667	0.9564832	0.48	-0.1	0.84	0.89	1.6	-0.31
KRIRKRIKKWLR	8.00	33	1681.153	12.99207	97.5	82.7583333	5.399166 67	-0.9575	0.9094241	0.49	-0.76	0.76	-1.81	2.62	1.27
KRIVKLILKWLR	5.00	58	1566.0553	12.54607	186.666 67	55.0916667	1.293333 33	-0.144166667	0.9564832	0.48	-0.24	0.82	0.25	1.9	0.09
GLPGPLGPAGPK	1.00	25	1060.2613	9.700016	73.3333 3	41.2666667	0.821666 67	0.303333333	0.2548238	0.49	0.05	0.38	-0.21	0.31	-0.09
LNLKALLAVAKK	3.00	67	1281.6479	11.103081	179.166 67	2.0916667	0.488333 33	0.158333333	0.4124666	0.58	-0.04	0.75	0.8	0.92	-0.08
GLFDIIKKIAESF	0.00	53	1480.7672	6.492972	127.692 31	20.4769231	0.126153 85	0.296923077	0.7127588	0.49	0.04	0.71	0.67	0.66	-0.03
FLPLIGRVLSGIL	1.00	61	1397.767	10.549999	202.307 69	32.3307692	1.546153 85	0.587692308	0.5867194	1	0.23	0.69	1.81	0.19	-0.88
LLPIVGNLLNSLL	0.00	61	1378.718	6.099982	232.307 69	4.4538462	1.749230 77	0.590769231	0.4517993	0.49	0.23	0.77	1.67	0	-1.03
FVQWFSKFLGRIL	2.00	61	1640.9914	11.651769	112.307 69	24.0461538	0.123076 92	0.336923077	0.6963173	0.83	0.07	0.7	0.82	1.1	-0.87
FLSGIVGMLGKLF	1.00	61	1381.7392	9.700016	142.307 69	-23.4230769	1.992307 69	0.647692308	0.4264853	0.86	0.27	0.62	1.67	0.28	-0.9
FFGSVLKLPKIL	2.00	61	1474.893	10.805394	172.307 69	2.2384615	1.618461 54	0.524615385	0.6474941	0.52	0.19	0.72	1.51	0.56	-0.71
ILAWKWAWWARRR	3.00	77	1829.1855	12.516461	83.0769 2	44.9846154	0.651538 46	0.137692308	0.5455389	0.49	-0.06	0.7	-0.28	3.32	-1.01
FKRIVQRIKDFLR	4.00	46	1719.1092	12.24367	112.307 69	18.7	3.489230 77	-0.389230769	0.9663389	0.5	-0.4	0.77	-0.44	1.23	0.48
IFKAIWSGIKSLF	2.00	61	1509.8545	10.805394	127.692 31	-15.3923077	0.986153 85	0.471538462	0.6285352	0.51	0.15	0.7	1.08	1.1	-0.73
ILGKIWEGIKSLF	1.00	53	1503.8477	9.537315	150	-2.0769231	0.806153 85	0.407692308	0.5904651	0.73	0.11	0.69	0.78	1.2	-0.43
IFSAIAGLLSNLL	0.00	69	1331.6179	6.099982	195.384 62	9.2307692	1.816923 08	0.674615385	0.4010355	0.54	0.28	0.73	1.93	0	-1.04
IFGAIAGLLKNIF	1.00	69	1376.7047	9.700016	165.384 62	29.9692308	1.836153 85	0.658461538	0.4577755	0.52	0.27	0.68	1.7	0.28	-0.91
ALWKTLLKKVLA	4.00	62	1511.9577	11.278354	157.692 31	7.8538462	0.376923 08	0.101538462	0.6619763	1	-0.08	0.74	0.45	1.66	-0.12

KIWFQNRMRKW KK	6.00	38	1849.2761	12.559571	30	46.7615385	3.793076 92	-0.604615385	0.2097722	0.16	-0.53	0.72	-1.86	2.67	0.46
RIWFQNRMRW RR	6.00	38	1961.3297	13.198992	30	135.6153846	6.676153 85	-0.921538462	0.2313818	0.15	-0.73	0.72	-2.05	2.29	0.46
KIWFQNKMKW KK	6.00	38	1793.2493	11.499612	30	45.9923077	2.351538 46	-0.446153846	0.230158	0.16	-0.43	0.72	-1.77	2.86	0.46
GLFDKLSLVSDF F	0.00	46	1468.7129	6.447271	112.307 69	-6.6692308	0.741538 46	0.150769231	0.573403	0.5	-0.05	0.7	0.34	0.56	0.05
GLFDIVKLVSD	0.00	54	1480.7673	6.447271	134.615 38	-2.3538462	0.169230 77	0.272307692	0.6534147	0.5	0.03	0.72	0.78	0.56	-0.08
FIKRIARLLRKIF	5.00	62	1674.1549	12.813636	157.692 31	36.0615385	1.806923 08	-0.102307692	1.0972005	0.82	-0.21	0.8	0.55	1.13	0.04
FLGALWNVAKSV F	1.00	69	1451.7312	9.700016	120	30.4076923	1.167692 31	0.517692308	0.4450659	0.84	0.18	0.66	1.21	0.82	-0.96
VRRFAWWAFL RR	4.00	69	1850.2076	12.977126	67.6923 1	100.6076923	2.626923 08	-0.148461538	0.4489677	0.66	-0.24	0.69	-0.27	2.35	-0.58
VRRFPFFPFLR R	4.00	54	1785.1736	12.977126	52.3076 9	171.4307692	2.755384 62	-0.137692308	0.4789948	0.17	-0.24	0.67	0.06	0.75	-0.29
FLYIVAKLLSGLL	1.00	69	1449.8398	9.298295	210	-3.8307692	2.323076 92	0.663846154	0.4252449	0.89	0.28	0.75	1.99	0.67	-1.1
FVPWFSKFLPRIL	2.00	62	1650.0422	11.651769	112.307 69	45.6615385	0.476923 08	0.383846154	0.6428803	0.54	0.1	0.7	0.88	1	-0.88
FLPIVAKLLSGLL	1.00	69	1383.7805	9.700016	210	10.9846154	2.333846 15	0.653076923	0.4375169	0.98	0.27	0.73	1.97	0.28	-0.92
AKKFGKAFVGEI M	2.00	54	1425.7522	10.506902	67.6923 1	5.1846154	0.053076 92	0.187692308	0.5113924	0.48	-0.03	0.59	0.29	0.94	0.11
ILGKLWEGLKSL F	1.00	54	1503.8477	9.537315	150	22.6692308	0.806153 85	0.358461538	0.5361941	0.89	0.08	0.69	0.67	1.2	-0.43
FVPWFSKFLGRI L	2.00	62	1609.9774	11.651769	112.307 69	36.6461538	0.549230 77	0.411538462	0.6252185	0.71	0.12	0.68	0.97	1	-0.88
GFGMALKLLKKV L	3.00	61	1417.8595	11.103081	150	-7.4	1.237692 31	0.325384615	0.5824719	0.86	0.06	0.67	1.03	0.85	-0.31
FVPWFSKFLKRIL	3.00	62	1681.0996	11.823063	112.307 69	55.1923077	-0.05	0.259230769	0.7352484	0.6	0.02	0.73	0.7	1.29	-0.65
FVPWFSKFLWRI L	2.00	69	1739.1387	11.651769	112.307 69	54.8615385	0.656153 85	0.436923077	0.6101225	0.57	0.13	0.73	0.93	1.54	-1.15
ILKKIWKPIKLF FKRWVQRWKRF LR	5.00	54	1655.1892	11.402903	150	-7.8769231	0.166153 85	0.067692308	0.8819109	0.41	-0.1	0.78	0.15	1.94	0.01
WKRWWQRWKRF FLR	6.00	46	1906.3157	12.984715	52.3076 9	144.2307692	4.364615 38	-0.602307692	1.0229035	0.46	-0.53	0.72	-1.35	2.48	0.24
WKRWWQRWKRF WLR	6.00	46	1945.3523	12.984715	52.3076 9	155.7923077	4.414615 38	-0.631538462	1.0229035	0.47	-0.55	0.72	-1.63	3.01	0.17
WKRWWRRWKRF WLR	6.00	46	1984.3889	12.984715	52.3076 9	209.3461538	4.464615 38	-0.660769231	1.0107281	0.55	-0.57	0.72	-1.92	3.55	0.1
FKRINQRIKDFLR	4.00	38	1734.0804	12.24367	90	19.4307692	5.186153 85	-0.79	1.1452151	0.63	-0.65	0.72	-1.99	3.64	0.32
FKRIQRIKDFLR	4.00	38	1748.1073	12.24367	90	40.0461538	4.310769 23	-0.532307692	0.8831423	0.5	-0.49	0.77	-1.03	1.23	0.62
FKRIHQRIKDFLR	4.00	38	1748.1073	12.24367	90	40.0461538	4.226153 85	-0.537692308	0.8804919	0.49	-0.49	0.76	-1.03	1.32	0.62
FKRIHQRIKDFLR	4.09	38	1757.1177	12.243671	90	34.7230769	4.158461 54	-0.503076923	0.8981806	0.5	-0.47	0.77	-1.01	1.34	0.56

FKRIVQRIKDGLR	4.00	38	1628.9845	12.24367	112.307 69	24.5	3.646153 85	-0.443846154	0.9397744	0.49	-0.43	0.72	-0.68	1.23	0.68
FKRIVQRIKDSL	4.00	38	1659.0108	12.24367	112.307 69	39.3153846	3.98	-0.494615385	0.9184659	0.48	-0.46	0.76	-0.72	1.23	0.7
FKRIVQRIKDNLR	4.00	38	1686.0364	12.24367	112.307 69	24.5	4.229230 77	-0.540769231	0.9021257	0.49	-0.49	0.78	-0.92	1.23	0.69
FKRIVQRIKDQLR	4.00	38	1700.0633	12.24367	112.307 69	24.5	4.144615 38	-0.546153846	0.9004153	0.48	-0.5	0.77	-0.92	1.32	0.69
FKRIVQRIKDHLR	4.09	38	1709.0737	12.243671	112.307 69	24.5	4.076923 08	-0.511538462	0.9121298	0.48	-0.47	0.77	-0.9	1.34	0.64
FFPVIGRILNGIL	1.00	61	1458.8098	10.549999	172.307 69	50.4	1.147692 31	0.576153846	0.6497079	0.5	0.22	0.69	1.58	0.19	-0.95
LNLKALLAVAKKI	3.00	69	1394.8073	11.103081	195.384 62	-3.8307692	0.829230 77	0.252307692	0.5760155	0.62	0.02	0.77	1.08	0.85	-0.22
LNLKLLAVAKKI	4.00	62	1451.9026	11.278354	187.692 31	-10.3615385	0.263076 92	0.089230769	0.63706	0.47	-0.09	0.79	0.65	1.13	0.05
GLMGTLSKQMK K	3.00	38	1434.8187	11.103081	90	20.9153846	0.524615 38	0.012307692	0.4938136	0.5	-0.14	0.64	-0.12	0.94	0.08
GILDAIKAIKAA G	1.00	64	1311.5874	9.537301	147.142 86	10.9142857	0.770714 29	0.382857143	0.6604573	0.47	0.1	0.63	1.01	0.52	-0.05
LKLSIVSWAKK VL	4.00	57	1613.0628	11.278354	160	-31.7714286	0.207142 86	0.127857143	0.6597052	0.17	-0.06	0.75	0.57	1.54	-0.11
IDWKKLLDAAKQI L	1.00	57	1655.0132	9.441551	153.571 43	33.8928571	0.648571 43	0.06	0.7058599	0.49	-0.11	0.78	0.06	1.37	0.13
INLLKIAKGIKSL	3.00	57	1523.966	11.103081	202.142 86	-21.0357143	-0.75	0.31	0.6911107	0.55	0.05	0.78	1.06	0.79	-0.26
IDWLKLGKMVID AL	0.00	64	1615.0067	6.447271	167.142 86	23.1928571	0.537857 14	0.340714286	0.5648021	0.49	0.07	0.76	0.87	1.02	-0.26
IDWLKLGKMVMD VL	0.00	64	1661.0937	6.447271	152.857 14	23.1928571	0.513571 43	0.320714286	0.5676604	0.49	0.06	0.76	0.86	1.02	-0.3
INLKILARLAKKIL	4.00	64	1607.1022	11.924506	209.285 71	18.6071429	0.010714 29	0.129285714	0.8392217	0.5	-0.06	0.82	0.9	0.96	-0.1
INLKALAALAKKIL	3.00	71	1479.9129	11.103081	195.714 29	10.9142857	0.962142 86	0.3	0.5835604	0.83	0.05	0.77	1.16	0.79	-0.26
KKKKPLFGLFFG LF	4.00	50	1670.1167	11.278354	83.5714 3	3.9	0.454285 71	0.215714286	0.3238837	0.5	-0.01	0.63	0.33	1.05	-0.24
DLRDSWKVIGSD KK	1.00	29	1646.8637	9.439892	76.4285 7	24.6714286	3.384285 71	-0.377142857	0.5253829	0.82	-0.39	0.68	-1.22	1.46	0.94
GILGKLWKGVKS IF	3.00	50	1545.9314	11.103081	132.142 86	13.6428571	0.842857 14	0.337142857	0.6269346	1	0.07	0.62	0.64	1.28	-0.38
LILGKLWKGVKS F	3.00	57	1602.0389	11.103081	160	19.7071429	1.127142 86	0.378571429	0.6269346	0.98	0.1	0.69	0.94	1.28	-0.51
SILGKLWKGVKS F	3.00	50	1575.9577	11.103081	132.142 86	19.7071429	0.532857 14	0.29	0.6269346	0.94	0.04	0.66	0.61	1.28	-0.36
FILGKLWKGVKS F	3.00	57	1636.0561	11.103081	132.142 86	19.7071429	0.988571 43	0.387857143	0.6269346	0.95	0.1	0.67	0.87	1.28	-0.56
KILGKLWKGVKS F	4.00	50	1617.0536	11.278354	132.142 86	13.6428571	0.379285 71	0.195714286	0.7095497	0.89	-0.02	0.67	0.39	1.54	-0.16

IDWKLLNAAKQI L	2.00	57	1654.0284	10.506901	153.571 43	33.8928571	0.5	0.068571429	0.6949739	0.5	-0.1	0.78	0.06	1.37	-0.07
GILGKLWEGVKS IF	1.00	50	1546.8728	9.537315	132.142 86	19.7071429	0.752857 14	0.391428571	0.5580913	1	0.1	0.62	0.67	1.11	-0.38
RLLRKFFRKLKK SV	7.00	43	1819.3163	12.825635	104.285 71	10.9142857	3.257142 86	-0.509285714	1.0779467	0.41	-0.47	0.74	-0.62	1.57	0.67
IDWKLLDAAKKI L	2.00	57	1655.0566	10.333346	153.571 43	10.9142857	0.649285 71	0.013571429	0.7496915	0.49	-0.14	0.78	0.04	1.54	0.33
LNLKALLAVAKKI L	3.00	71	1507.9667	11.103081	209.285 71	10.9142857	1.121428 57	0.31	0.5760155	0.56	0.05	0.79	1.28	0.79	-0.33
ANLKALLAVAKKI L	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	10.9142857	0.899285 71	0.278571429	0.5760155	0.73	0.03	0.76	1.14	0.79	-0.24
LALKALLAVAKKI L	3.00	79	1464.9417	11.103081	216.428 57	10.9142857	-1.725	0.41	0.5760155	0.63	0.12	0.77	1.66	0.79	-0.38
LNKALLAVAKKI L	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	16.9785714	0.899285 71	0.278571429	0.5573636	0.73	0.03	0.76	1.14	0.79	-0.24
LNLAALLAVAKKI L	2.00	79	1450.8714	10.805394	216.428 57	16.9785714	1.647142 86	0.461428571	0.3996675	0.57	0.15	0.78	1.69	0.52	-0.58
LNLKAALAVAKKI L	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	10.9142857	0.899285 71	0.278571429	0.5360167	0.73	0.03	0.76	1.14	0.79	-0.24
LNLKALAAVAKKI L	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	10.9142857	0.899285 71	0.278571429	0.5845828	0.73	0.03	0.76	1.14	0.79	-0.24
LNLKALLAAAKKI L	3.00	71	1479.9129	11.103081	195.714 29	10.9142857	0.962142 86	0.277142857	0.5560048	1	0.03	0.77	1.11	0.79	-0.26
LNLKALLAVAAKI L	2.00	79	1450.8714	10.805394	216.428 57	10.9142857	1.647142 86	0.461428571	0.4447304	0.57	0.15	0.78	1.69	0.52	-0.58
LNLKALLAVAKAI L	2.00	79	1450.8714	10.805394	216.428 57	16.9785714	1.647142 86	0.461428571	0.5092879	0.57	0.15	0.78	1.69	0.52	-0.58
LNLKALLAVAKK AL	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	3.2214286	0.899285 71	0.255714286	0.511439	0.61	0.02	0.75	1.09	0.79	-0.24
LNLKALLAVAKKI A	3.00	71	1465.8861	11.103081	188.571 43	-2.8428571	0.899285 71	0.278571429	0.5760155	0.73	0.03	0.76	1.14	0.79	-0.24
GNLKALLAVAKKI L	3.00	64	1451.8592	11.103081	181.428 57	4.85	0.837142 86	0.268571429	0.5760155	0.61	0.03	0.72	0.98	0.79	-0.2
LNLKALGAVAKKI L	3.00	64	1451.8592	11.103081	181.428 57	4.85	0.837142 86	0.268571429	0.5878537	0.61	0.03	0.72	0.98	0.79	-0.2
KNLKALLAVAKKI L	4.00	64	1522.9814	11.278354	181.428 57	10.9142857	0.373571 43	0.127142857	0.5760155	0.58	-0.06	0.77	0.73	1.05	0.01
GNLKALAAVAKKI L	3.00	64	1409.7786	11.103081	160.714 29	4.85	-0.615	0.237142857	0.5845828	0.67	0.01	0.69	0.84	0.79	-0.11
LNLRALLAVARRI L	3.00	71	1592.0069	12.801075	209.285 71	77.7142857	0.886428 57	0.089285714	0.782689	0.49	-0.09	0.79	1.15	0.53	-0.33
LNLKLLAVAKKI L	4.00	64	1565.062	11.278354	202.142 86	4.85	0.595714 29	0.158571429	0.63706	0.46	-0.04	0.8	0.87	1.05	-0.08
LNLKLLKVAKKI L	5.00	57	1622.1573	11.402903	195	-7.2785714	-0.07	0.007142857	0.8295743	0.49	-0.14	0.81	0.46	1.31	0.17

GNLKLLAVAKKI L	4.00	57	1508.9545	11.278354	174.285 71	-1.2142857	0.311428 57	0.117142857	0.63706	0.42	-0.07	0.73	0.57	1.05	0.05
LNLKLLAAVAKKI L	4.00	64	1522.9814	11.278354	181.428 57	4.85	0.373571 43	0.127142857	0.6334828	0.58	-0.06	0.77	0.73	1.05	0.01
FIGALLRPALKLL A	2.00	71	1495.9148	11.651769	188.571 43	32.3642857	1.314285 71	0.45	0.6060728	0.51	0.14	0.71	1.52	0.44	-0.63
FIGALLGPLLNL K	1.00	64	1481.8848	9.700016	202.142 86	-2.8428571	2.065714 29	0.596428571	0.4086491	0.59	0.23	0.71	1.58	0.26	-0.89
GGLIGTLTAKQIK K	3.00	36	1427.7505	11.103081	118.571 43	22.8857143	0.215714 29	0.106428571	0.4709315	0.83	-0.08	0.59	0.04	0.88	0.05
KLLNLLPGLLAGI F	1.00	64	1481.8848	9.700016	202.142 86	10.9142857	2.065714 29	0.596428571	0.4086491	0.59	0.23	0.71	1.58	0.26	-0.89
ALLKLAPRLLAGI F	2.00	71	1495.9148	11.651769	188.571 43	-0.5357143	1.314285 71	0.45	0.6060728	0.51	0.14	0.71	1.52	0.44	-0.63
FLSHIAGFLSNLF GK	1.09	53	1650.9406	9.702002	110.666 67	32.9666667	0.577333 33	0.444666667	0.4343188	0.52	0.14	0.65	0.87	0.34	-0.79
FKRLKLFKFIW NWK	7.00	47	2063.6089	12.101753	78	-4.64	1.965333 33	-0.320666667	0.9060903	0.8	-0.35	0.75	-1.03	2.56	0.27
IWRIFRIFRIFIR F	5.00	67	2139.6693	13.102061	130	47.52	2.383333 33	-0.012	1.1586777	1	-0.16	0.8	0.69	1.28	-0.49
VNWKSLGKSIK VVK	5.00	40	1714.1276	11.402903	110	-16.48	1.064	-0.111333333	0.5900793	0.83	-0.22	0.68	-0.33	1.69	0.29
VNWKKILGKSIK SK	5.00	40	1728.1544	11.402903	116.666 67	-7.38	1.005333 33	-0.091333333	0.5907193	0.71	-0.2	0.7	-0.31	1.69	0.27
VSWKSLGKIIKV VK	5.00	47	1713.1832	11.402903	136	-15.2266667	0.293333 33	0.032666667	0.7025252	0.83	-0.13	0.7	0.2	1.69	0.15
VNSKISGKSIK SK	5.00	27	1602.9382	11.402903	90.6666 7	-13.3066667	1.942	-0.24	0.4260767	0.64	-0.3	0.66	-0.61	1.22	0.65
VNRKILGKSIK VK	6.00	40	1710.1831	12.054565	136	-2.3866667	1.659333 33	-0.23	0.6267952	0.83	-0.29	0.71	-0.22	1.39	0.57
VNSKISPKSIK SK	5.00	27	1643.003	11.402903	90.6666 7	21.6466667	2.004666 67	-0.264	0.4524371	0.83	-0.31	0.68	-0.69	1.22	0.65
ANFLPKIFCKITR KC	3.87	53	1782.2384	10.512673	84.6666 7	0.8333333	1.046	-0.022666667	0.777648	0.5	-0.16	0.7	0.21	0.9	-0.07
TRKRLKIGKVLK WI	7.00	40	1867.4011	12.57238	123.333 33	2.7666667	2.211333 33	-0.357333333	0.7557005	0.49	-0.37	0.71	-0.65	2.01	0.57
RVVRPVVQVVK QKVR	5.00	47	1790.2322	12.813636	135.333 33	38.1933333	2.577333 33	-0.307333333	0.9021363	0.49	-0.34	0.7	-0.03	1.15	0.33
RIIRPIIQIKQIR	5.00	47	1888.4198	12.813636	182	26.64	2.166666 67	-0.167333333	0.9961763	0.49	-0.25	0.82	0.11	1.15	0.19
RLLRPLLQLLKQ KLR	5.00	47	1888.4198	12.813636	182	74.0533333	2.166666 67	-0.316666667	0.8958776	0.49	-0.35	0.8	-0.22	1.15	0.19
FKLKLKFKKILK LK	8.00	47	1903.5582	11.645552	130	-37.4866667	0.922666 67	-0.266666667	0.8782608	0.62	-0.32	0.79	-0.39	1.96	0.67



KNKRKRRRRRRGGRRRR	14.00	0	2348.808	13.50286	0	333.511764 7	10.91352 941	-1.891176	0.4856867	0.47	-1.35	0.6	-3.85	2.23	2.48
FLGGLIKIVPAMICAVTKKCHH HHHH	4.00	50	2928.576	9.672349	105	28.6538462	0.042692 31	0.2384615	0.3957406	0.49	0.01	0.67	0.34	0.76	-0.51
FFGTFLFKLGSKLIPGVMKLFSK KKER	6.00	42	3000.725	11.457677	86.1538 46	-	0.718076 92	0.03769231	0.6085757	0.55	-0.12	0.64	0.02	0.99	0.09
GKYGfYTHVfRLKKWIKVID QFGE	3.09	36	3088.605	10.237626	70	-0.372	1.3724	1.66534E-18	0.8078533	0.49	-0.15	0.65	-0.52	1.58	-0.14
RLLFRKIRRLKR	7.00	42	1655.115	13.107432	130	69.9166667	5.253333 33	-0.825	0.9095883	0.48	-0.67	0.78	-0.97	1.63	0.94
FFGWLIKPAIHAGKAIHGLIHR RH	5.36	48	2932.522	12.813623	105.6	81.556	1.1376	0.0824	0.5616721	0.75	-0.09	0.65	-0.05	1.1	-0.31
FFGWLIKGAIHAPKAIHGLIHR RH	5.36	48	2932.522	12.813623	105.6	81.176	1.1376	0.0824	0.5449308	0.75	-0.09	0.65	-0.05	1.1	-0.31
FFGWLIKGAIHAGKAIHPLIHR RH	5.36	48	2932.522	12.813623	105.6	73.072	1.1376	0.0824	0.5929191	0.75	-0.09	0.65	-0.05	1.1	-0.31
FFGWLIKGAIHAPKAIHPLIHR RH	5.36	48	2972.587	12.813623	105.6	84.172	1.1752	0.068	0.5756614	0.59	-0.1	0.66	-0.1	1.1	-0.31
GLTRLFsvik	2.00	50	1133.399	11.651769	146	0.51	0.372	0.199	0.6121546	0.57	-0.02	0.68	0.88	0.61	-0.35
AWKEKIRKKLKNEIKKKWRKA VIAW	9.00	44	3179.938	11.602982	86	3.72	2.5564	-0.41	0.6791641	0.49	-0.41	0.72	-1.22	2.45	0.75
KFKKLFKLLSPVIGKEFRIVER IKRFLR	10.00	41	3633.564	12.189408	100.689 655	30.3862069	2.435862 07	-0.3082759	1.1005208	0.44	-0.34	0.71	-0.5	1.44	0.64
HGVSGHGQHGTHG	0.00	8	1267.286	7.880118	22.3076 92	-	1.646923 08	0.06153846	0.2424501	0.49	-0.11	0.41	-1.2	0.54	-0.26
GRFKRFRKKLRLWHKVGPFV GPILHY	9.18	37	3365.129	12.540407	79.2592 59	69.3407407	2.038518 52	-0.1992593	0.8870408	0.52	-0.27	0.64	-0.66	1.59	0.1
RRLRPRRPLRPRRPRRPR R	12.00	9	2895.518	13.541401	35.4545 45	112.990909	7.690909 09	-1.24	0.3820814	0.49	-0.94	0.59	-2.69	1.34	1.47
GIGKWLHSAKFKGAFVGEIM NS	3.09	43	2505.963	10.802733	72.1739 13	5.2608696	0.447391 3	0.1569565	0.6561155	0.26	-0.05	0.59	-0.08	1.06	-0.1
GMASKAGAIAGKIAKVALKAL	4.00	61	1969.46	11.278354	121.428 571	-4.8142857	-0.76	0.2952381	0.5970861	0.17	0.04	0.59	0.84	0.7	-0.06
FWGTLAKWALK	2.00	64	1320.6	10.805394	89.0909 09	29.4363636	0.760909 09	0.3272727	0.4558508	0.52	0.06	0.63	0.3	1.93	-0.75
FWGTLAKWALKAI	2.00	69	1504.838	10.805394	113.076 923	-	1.161538 46	0.4307692	0.4978385	0.52	0.13	0.65	0.74	1.63	-0.82
FWGTLAKWALKAI PAAMGMK QNK	4.00	57	2562.132	11.278354	72.6086 96	18.8521739	0.046956 52	0.1778261	0.5071073	0.54	-0.03	0.62	0.01	1.3	-0.34
AGKETIRQYLKNEIKKKGRKAV IAW	6.00	36	2929.505	11.10601	86	8.408	2.3316	-0.282	0.6522681	0.42	-0.33	0.66	-0.93	1.71	0.56
AGKEKIRKKLKNEIKKKGRKAV AW	9.00	36	2921.616	11.602982	86	-3.072	2.6676	-0.4364	0.6522681	0.48	-0.42	0.67	-1.18	1.9	1.02
AWKEKIRKKLKNEIKKKGRKAV IAW	9.00	40	3050.777	11.602982	86	0.324	2.612	-0.4232	0.6522681	0.49	-0.42	0.69	-1.2	2.17	0.89
AGKEKIRKKLKNEIKKKWRKAV IAW	9.00	40	3050.777	11.602982	86	0.324	2.612	-0.4232	0.6791641	0.49	-0.42	0.69	-1.2	2.17	0.89
LWKIGKIIWRVVLWNWR	5.00	56	2182.691	12.54607	115.625	24.2875	1.196875	-0.04125	0.8582406	0.5	-0.17	0.73	-0.46	2.73	-0.44
VFRLKKWIKVI	4.00	58	1557.989	11.924506	145.833 333	-4.9833333	0.746666 67	0.008333333	0.6660284	0.49	-0.14	0.78	0.28	1.8	-0.17
HVFRLKKWIKVIDQFGE	2.09	44	2271.693	10.500669	97.2222 22	-8.3666667	1.709444 44	-0.06222222	0.8078533	0.48	-0.19	0.71	-0.44	1.42	0.06
FYTHVfRLKKWIKVIDQFGE	2.09	43	2683.151	10.117216	83.3333 33	5.7380952	1.452380 95	0.01333333	0.8078533	0.5	-0.14	0.7	-0.34	1.46	-0.2
IRIILRAQGALKI	3.00	62	1464.861	12.516461	195.384 615	19.2692308	0.526923 08	0.15	0.5854958	0.49	-0.05	0.75	0.95	0.76	-0.2

GRLIDKIARKLVKKIQRFARKFF	8.00	48	2832.524	12.538966	106.086 957	-6.4521739	2.589130 43	-0.2930435	1.0076592	0.52	-0.33	0.72	-0.33	1.28	0.49
FLKAIKKFGKEFKKIGAKLK	7.00	45	2322.952	11.277729	88	-27.73	0.8545	-0.1045	0.8798726	0.38	-0.21	0.66	-0.35	1.53	0

PEPTIDO	CARGA NETA	% DE RESIDUOS HIDROFOBICOS	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELECTRICO	ÍNDICE ALIFATICO	ÍNDICE DE INESTABILIDAD	ÍNDICE DE BOMAN	ÍNDICE DE HIDROFOBICIDAD	ÍNDICE DE MOMENTO HIDROFÓBICO	HEMOLISIS	GRAVY (HIDROPATIDAD)	Steric hindrance	Hydrophobicity	Amphiphilicity	Hydrophilicity
VDKPDYRPRPRPPNM	2	13	1838.118	10.4383	19.33	13.63333	4.542667	-0.606	0.2302518	0.49	-0.53	0.6	-2.07	1.07	0.87
VDKPDYRPRPWPRPN	2	13	1893.138	10.4383	19.33	-1.126667	4.54	-0.5946	0.3998722	0.49	-0.53	0.6	-2.26	1.53	0.73
VGALAVVWLWLW	0	93	1811.246	6.09	194.667	70.05	-3.314	0.9013	0.0832452	0.82	0.43	0.72	2.11	1.85	-1.85
VAIALKAAHYHTHKE	1	46	1688.95	9.2632	98	46.2933	0.8985567	0.08466	0.325474	0.49	-0.09	0.68	-0.21	1.2	-0.15
VWPLGLVICKALKIC	2	73	1656.164	8.821667	175.33	-1.9866	-1.94	0.514	0.4457968	0.51	0.18	0.71	1.66	0.95	-0.79
LGPALITRKPLKGPK	5	33	1589	11.26	110.67	-4.86	0.71	0.377	0.065	0.5	-0.17	0.59	-0.32	0.9	0.26
KWKLFFKIGAVLKV	5	60	1771.31	10.6	149.33	-28.99	-0.53	0.583	0.483	0.41	-0.05	0.72	0.54	1.69	-0.11
VGALAVVWLFLWLW	0	93	1772.21	5.49	194.67	346.04	-3.35	1.389	0.148	0.82	0.44	0.72	2.35	1.39	-1.79
VGALAVVWLWLW	0	86	1788.21	5.49	194.67	46.04	-3.15	1.334	0.106	0.82	0.4	0.72	2.08	1.72	-1.78
FASLLGKALKALAKQ	3	60	1558.93	10.3	130.67	13.8	-0.34	0.44	0.592	0.87	-0.02	0.66	0.59	0.82	-0.15
IIGHLIKTAGMLGL	1	60	1549.98	8.76	188.67	3.67	-1.9	0.876	0.412	0.52	0.24	0.68	1.56	0.34	-0.82
TSRCYIGYRRKVCS	4	33	1791.12	9.84	64.67	37.77	2.9	0.36	0.161	0.49	-0.33	0.63	-0.32	1.41	0.05
SKGKANKDVELARG	3	26	1600.84	10	58.67	8.14	3.21	-0.232	0.139	0.48	-0.43	0.59	-1.37	1.23	1.15
KQQLATEAESAGPIL	-1	40	1555.75	4.53	98	76.48	1	0.297	0.225	0.48	-0.1	0.62	-0.26	0.58	0.16
YQEPVLPVVRGPFPI	0	33	1668.96	6	90.67	80.71	0.3	0.647	0.316	0.49	0	0.56	-0.03	0.67	-0.35
VNWKKVLGKIIVAK	5	53	1724.21	10.6	142.67	-25.88	0.16	0.398	0.581	0.59	-0.12	0.71	0.19	1.69	0.09
VNWKKILGKIIVAK	5	53	1738.24	10.6	149.33	-13.04	0.1	0.437	0.6	0.52	-0.1	0.73	0.21	1.69	0.07
VNWKKILGKIIVVK	5	53	1766.29	10.6	162	-14.96	-0.04	0.497	0.657	0.56	-0.08	0.75	0.37	1.69	0.01
LNLKGIFKQVASLLT	3	53	1645.06	10.3	156	-23.33	-0.34	0.571	0.465	0.52	0	0.72	0.76	0.73	-0.29
IIGHLIKTAGFLGL	1	60	1565.96	8.76	188.67	3.67	-1.95	0.913	0.437	0.54	0.26	0.67	1.62	0.34	-0.9
ILGIITSLKSLGK	3	46	1584.02	10.3	182	5.19	-0.68	0.627	0.615	0.55	0.04	0.71	0.93	0.73	-0.23
FVDLKKIANIINSIF	1	60	1735.1	8.59	156	17.29	0	0.668	0.524	0.57	0.07	0.79	0.95	0.49	-0.42
FIFPKNIINSIFGR	3	46	1794.17	11.17	104	51.47	0.87	0.597	0.32	0.49	-0.06	0.71	0.24	0.65	-0.33
GLLGTGNLLNGLGL	0	46	1424.7	5.52	182	-12.01	-1.55	0.731	0.464	0.49	0.2	0.59	1.13	0	-0.84

GTKRGKLCRISRLAL	5	40	1672.07	11.72	110.67	21.27	2.47	0.264	0.166	0.49	-0.33	0.64	-0.23	0.98	0.41
GFGSKPLDSFGLNFF	0	40	1632.84	5.84	52	7.13	0.2	0.589	0.242	0.49	0.06	0.56	0.23	0.24	-0.45
GFGSKPIDSFGLSWL	0	40	1610.83	5.84	78	25.37	-0.09	0.658	0.282	0.5	0.08	0.56	0.28	0.71	-0.46
INWKKIKSIKAA MN	4	53	1758.2	10.48	117.33	-14.56	0.72	0.407	0.428	0.49	-0.13	0.76	-0.05	1.44	-0.01
VVYTLKRNRTL YGF	3	33	1787.09	10.28	90.67	7.27	1.64	0.431	0.412	0.49	-0.17	0.63	-0.16	1.25	-0.35
VVYALKRNRTL YGF	3	40	1757.07	10.28	97.33	28.71	1.35	0.434	0.413	0.49	-0.14	0.63	0.01	1.25	-0.36
FLTGLIGLMKALGK	2	53	1518.92	10	136.67	6.24	-1.45	0.681	0.586	0.94	0.15	0.59	1.07	0.49	-0.51
FLSGLIGLAKMLGK	2	53	1504.89	10	136.67	33.63	-1.4	0.661	0.61	0.96	0.14	0.59	1.07	0.49	-0.47
GLEETVYIYGAN MAS	-2	40	1617.79	3.79	84.67	22.95	0.31	0.455	0.224	0.48	0.04	0.61	0.17	0.84	-0.39
THRLRRWCRAR GLAR	6	40	1908.27	12.3	65.33	92.89	5.24	0.143	0.19	0.48	-0.6	0.64	-1.23	1.54	0.54
RICRTRLTRRAG NSL	5	33	1773.09	12.18	84.67	41.86	4.73	0.125	0.189	0.48	-0.52	0.65	-0.81	0.82	0.52
VGVKRRLKCLLS LRS	5	46	1728.18	11.72	142.67	110.99	2.17	0.379	0.232	0.46	-0.31	0.7	0.19	0.98	0.29
SRATWARVRRL GLYG	4	40	1762.05	12	84.67	34.66	2.93	0.309	0.19	0.48	-0.31	0.59	-0.47	1.45	0.01
FFQELKEGWKNIKKA	2	40	1866.19	9.53	58.67	48.37	1.8	0.239	0.694	0.45	-0.25	0.68	-1.01	1.69	0.39
RSMRLSFRARG YGFR	5	33	1860.17	12.18	32.67	16.62	4.3	0.177	0.225	0.48	-0.45	0.59	-0.87	1.15	0.31
VNFLHKKIYGNIR YS	2	40	1837.15	9.7	123.33	22.39	0.96	0.588	0.36	0.49	-0.06	0.73	0.08	1.18	-0.64
GLLSGILGAGKKI VF	2	53	1472.83	10	156	-6.13	-1.51	0.667	0.388	0.62	0.18	0.59	1.27	0.49	-0.48



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 7 de noviembre del 2023.

### VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: “**Diseño de variantes del péptido antimicrobiano VC15 y su interacción con membranas lipídicas**”, que presenta el **C. Zuriel González Carrera**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL y codirección del DR. LEONARDO DAVID HERRERA ZÚÑIGA, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

#### Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL (directora de tesis, CEIB UAEM)

DR. LEONARDO DAVID HERRERA ZÚÑIGA (codirector de tesis, TESH)

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE (CEIB UAEM)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB UAEM)

DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY (ICF UNAM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2023-11-07 15:09:30 | Firmante**

SrEDWb7Nw6ka7JZNIY+1Gs/Y3wJzEie05T7XszUsT1+wOPn3H60Lq/lk8BMX55U+fG9V5+ZK67+LnS2/VfGVsz1OITipuM076dVtr0GYeGRbdaSJ1PyDSMOy4hO9bYsykBJbmAalQEHa93IY85ZEEU0QaYpUir6zplU9bSxefR1Db7GUtRcY5Ud6KwOPuV4kalvidDR0u47JUKxpfW4eghRRYCSyDABMv8GvVz11X1sO+4hnMDo4pK6x0UAkqe5As7595DMkK3hCctakJpvmZkdVKM6ISY33V43K5W+OsEBrf4e/7wzESs6X+wTsJ29YxdjHgwzHMOg8BI7w==

**JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-11-07 15:44:41 | Firmante**

zLVleGwYVNGtvTjzm05JuaMwKNJX0/5/Qd1NMJykNmKf3WEp7Y1kD6hvDB361MMcs8KwC8YzgaeIWeun0rZdDlflGSxdlcodh/TGllK8+BC5ZpLSG9WETWdM6UCIWWXhNR2kPU3mZy3eAbw3nH/ubTT21vysqpL97cBQ9+8fBkHvq8cYpf0GfJT1tX38ljaw+v/Z/mZs8uxGlnKSuc1r3TEdugy11Zq4UCwQ7NBodzJuOzht6Zg/XTrYSJEH2nnkMkAPIng611WfpcULpOAS+7Qq84wMmKWUuPdvbedjMil6wHYRjYucr9Gf16r75tw+/0/Ek59fNyt/WqzA==

**LEONARDO DAVID HERRERA ZÚÑIGA | Fecha:2023-11-07 17:21:55 | Firmante**

LNWEkAPOR+C9ixuz5KjIcQrTivW7V9TAatshoY8RB+fQ7IpDFS9e5O5TEwKGyp4y9ISwqYfGlvBsgzm8ze3OEDyMnvl1AmT6iIHqqWBp1XpQ5HhBKhLgVHO7XjfGCx5rbbc5BEi8+h7JcKmj5jupr/4LmnJ/R2pqEb/SvIbGAR93NdwprRX5InHhkQj3mY1VKYsVXw5nwEbXIBWvuQ/0v9J7EFUJrORIOC00n4wPFwUlfoX7hBT4I933DV3CeUndYdBCMKdjQf2GMJxe3s4wbpLnshbFXZodNoBAggWIQGM4ZStbIM+Z434c7DDCJ7LC8oXUcxl+h0mf2nS+YpqbW==

**ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY | Fecha:2023-11-07 19:24:40 | Firmante**

Eh4mbZ83eQDYPqD7Ouf1NfzpmKiEGBzjhmj8Cdu+UXWtgsx6JR13Ftlgw/QjoDcHzVBrXhyjsGc53AhTj4HP3hHWBRrnZCmdYN2x4c6km/lzDUuUxVPvdnGLEo7cZ19TgGR7kWd5qJR0k+smJLuYeN73lPfa+DMdawsH2rGO6KJM8Cy1XB4/y7qPggZRQJpUblRwcpGLbwlhERFBP8nGrIVH52glgT91FLUL4UNZ5Y96SfKWCP6kMPSN66igB5Kvs7Qj3vBwr76QBavzh3LrzJpn+LXLtnOCqwtvDLOak0IEpVA+rCYah5ezTeUFW4Xn13RLi6IGP0Qczcu02A==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2023-11-07 20:02:17 | Firmante**

lqMTOJjkCPTibe9oircul7FGbReH4bJf2TdOrJ0gGr829kJITeyPvOld+3G/74ZS/5r25nVK9IE88TX4LzeyrWVOVMegXjpHB1nkBuZIU7g+JR/v0HO3DFx9BL9vJlhH3ejD8gm4GlarMVC6DX/3guXCJlxxllHg/FCU3ROMMkm+cVmsw8XRzZcFPsrZU/vlpdhoULOV9K87c8IXCdNxrJmMfKpEtv5RbVi2FsKH4aGvKD+X1EPz+Xw5rr69u/aQGtiTpD/OMVw51iyBVF Bni4tiVOKlhtk5CMHSrjV9sroSymuVqsr5CduX7ulbuE4lln1E27/m+O62THoplzVQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YAgHdsKDG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gz65CpCMSQGaRPGMARTdJNh3BptRGQY>

