PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Modelamiento y estudio computacional del péptido Picturina – 2 extraída de la secreción cutánea de la rana *Boana Picturata*

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica

José Gabriel Cevallos Guerrero

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de la Licenciatura en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica del Sr. José Gabriel Cevallos Guerrero ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentado para la calificación correspondiente.



Dra. Lorena Meneses
Directora de la Disertación
Quito, 2 de marzo de 2023

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

A los 15 millones de personas que han fallecido en la pandemia del COVID – 19 (SARS-CoV-2) por falta de antivirales eficaces en contra del Síndrome Respiratorio Severo coronavirus 2 que todo el mundo ha tenido que soportar. Y, esperando, que esta tesis, ayude en alguna medida a inspirar a más investigadores a descubrir nuevas moléculas antimicrobianas.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer especialmente a mis padres por acompañarme en esta etapa de mi vida. Asimismo, a la Dr. Carolina Proaño de la Universidad IKIAM, que nos proporcionó la información del péptido.

ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓNII

DEDICATORIAIII

AGRADECIMIENTOSIV

ÍNDICE GENERALV

ÍNDICE DE TABLASVI

ÍNDICE DE FIGURASVI

RESUMEN7

PALABRAS CLAVE**¡Error! Marcador no definido.**

ABSTRACT8

KEYWORDS8

INTRODUCCIÓN9

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS12

OBJETIVO GENERAL12

OBJETIVOS ESPECÍFICOS12

MATERIALES Y MÉTODOS13

RESULTADOS Y DISCUSIÓN15

PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA PICTURINA -15

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PICTURINA -20

CONSTRUCCIÓN MOLECULAR DE LA PICTURINA –22

OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA Y MINIMIZACIÓN ENERGÉTICA MEDIANTE EL USO DEL SOFTWARE GAUSSIAN0923

ACOPLAMIENTO MOLECULAR CON ENZIMAS INHIBITORIAS MEDIATE EL PROGRAMA AUTODOCK VINA24

CONCLUSIONES29

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS30

TABLAS50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de Propiedades Fisicoquímicas del Péptido Picturina - 2 Extraídas del Servidor PepCalc y Bachem.....39
Tabla 2. Secuencias, Peso Molecular, Carga Neta y Porcentaje Hidrofóbico de Aminoácidos de los Péptidos Estándares y el de Interés.....39
Tabla 3. Actividades Antimicrobianas de los Péptidos Estándares y el de interés en Condiciones Estándar de Ensayo de Actividad Antimicrobiana.....40
Tabla 4. Valores de Afinidad entre la Picturina - 2 y Diferentes Enzimas.....41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de rueda helicoidal del péptido Picturina – 2 generado con HeliQuest......40
Figura 2. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de Jpred......41
Figura 3. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de PredictProtein......42
Figura 4. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de GOR4......43
Figura 5. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de I-TASSER......44
Figura 6. Proyección molecular de la Picturina – 2 obtenida mediante el programa PyMOL......45
Figura 7. Visualización molecular de la estructura optimizada y energéticamente estable de la Picturina – 2 obtenido en Gaussian09......46
Figura 8. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) "Penicillin-binding protein 2a"– 2PIC y b) AmiA – 2PIC......46
Figura 9. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) GyrB– 2PIC y b) "Penicillin-binding Protein 1b" – 2PIC......47
Figura 10. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) OmpC– 2PIC, b) OmpF– 2PIC y c) AmpD–2PIC......48
Figura 11. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) Exo-β-(1,3)-glucanasa – 2PIC y b) Proteasa aspártica secretada – 2PIC......49

RESUMEN

En este trabajo de titulación se analizó y modeló un nuevo peptido antimicrobiano, llamado Picturina — 2, extraído de la piel de la rana *Boana Picturata* (localizada en la Amazonía Ecuatoriana). Se utilizaron enfoques de diseño de fármacos asistidos por computadora (CADD, siglas en ingles) para alcanzar este objetivo, como modelamiento estructural de proteínas, optimización estructural, y acoplamiento molecular. Está molécula comparte sus propiedades fisicoquímicas con la mayoría de péptidos antimicrobioanos conocidos. La estructura optimizada resultante fue de alta helicidad. Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que tienen una alta afinidad con las macromoléculas: N-acetilmuramoil-L-analina amidasa, subunidad B de la ADN girasa, porina F de la membrana externa, proteinasa aspártica secretada; con valores de afinidad de -7,3, -7,8 -8,0 y -6,4 kcal/mol, respectivamente. Está información contribuirá con los próximos pasos de CADD, como la simulación de dinámica molecular.

PALABRAS CLAVE: Acoplamiento molecular, macromóleculas, optimización energética y estructural, propiedades fisicoquímicas y péptido antimicrobianos.

ABSTRACT

This work analyzed and modeled a novel antimicrobial peptide, Picturina - 2, extracted from the skin frog of *Boana Picturata* (located in the Ecuadorian Amazon). Computer-aided drug design (CADD) approaches were used to reach this target, such as protein structure modeling, structure-based optimization, and molecular docking. This molecule shared all their physicochemical properties with the most known AMPs (antimicrobial peptides). The result optimized structure was high helicity structure. The results of molecular docking showed that it has a high affinity with these molecules: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, DNA gyrase subunit B, Outer membrane porin F, and Secreted aspartic proteinase; with values of free energy binding (-7.3, -7.8, -8.0, and -6.4 kcal/mol, respectively). This information will contribute with the next steps of CADD, like molecular dynamics simulation.

Keywords: Antimicrobial peptides, energy and structural optimization, macromolecules, molecular docking, and physicochemical properties.

INTRODUCCIÓN

Según el Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de los Estados Unidos (CDC, siglas en inglés), la resistencia antimicrobiana: “Es uno de los retos más grandes de salud de nuestros tiempos”(CDC 2020a). Se debe, en gran parte, al uso indiscriminado de antibióticos en la cría de animales y la acuicultura, al igual que, el uso de múltiples agentes de amplio espectro y la falta de una buena gestión antimicrobiana (Vivas et al. 2019). El término antimicrobiano incluye: antibióticos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios, anticancerígenos (Huan et al. 2020); en sí, son medicamentos capaces de prevenir y tratar infecciones en humanos, animales y plantas (Burnett-Boothroyd y McCarthy 2011).

El problema de la resistencia antimicrobiana se enfoca especialmente en la alarmante propagación mundial de las bacterias “multirresistentes”, (también conocidas como “superbacterias”) que causan infecciones que no pueden ser tratadas con antibióticos convencionales (Prestinaci, Pezzotti, y Pantosti 2015)

A propósito de la crisis de la resistencia antimicrobiana y en especial a los antibióticos, sus efectos están siendo sentidos en los avances de la medicina moderna. Concretamente, en los campos de la cirugía, trasplantes de órganos, tratamiento de infecciones, entre otros (van Duin y Paterson 2016; Friedman, Temkin, y Carmeli 2016). Por consiguiente, según datos del Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de los Estados Unidos, 1.7 millones de adultos desarrollan un episodio de sepsis al año (CDC 2020b). La sepsis es una respuesta inmunitaria extrema del cuerpo frente a una infección, por lo que, sin tratamientos eficaces con antibióticos, puede causar daño tisular, insuficiencia orgánica y, por último, la muerte (Hotchkiss et al. 2016).

De igual manera, todos los pacientes que se someten a una cirugía corren el riesgo de contraer infecciones pre y posoperatorio, y al igual que, en el caso anterior, sin antibióticos efectivos, muchas cirugías no serían posibles hoy en día (Khoshbin et al. 2015). De hecho, un informe del 2021 de la Organización Mundial de la Salud manifestó que 1 de cada 5

mujeres (21 %) a nivel mundial se realizaron una cesárea, lo que se traduce en que aproximadamente un billón de personas (mujeres) se encuentran bajo alto riesgo de infección posparto (OMS 2021a).

También las enfermedades crónicas (en particular, la diabetes) ponen a las personas en mayor riesgo de infección (Casqueiro, Casqueiro, y Alves 2012). Es más, algunos fármacos que se usan para tratar dicha enfermedad pueden debilitar el sistema inmunitario, y más de 422 millones de personas que padecen diabetes en el mundo deben ser tratados con antibióticos para infecciones comunes (OMS 2021b). Del mismo modo, los receptores de trasplantes de órganos son los más vulnerables a infecciones porque se someten a cirugías complejas. Y, sumando el hecho de que, los receptores reciben medicamentos para inhibir el sistema inmunitario, se aumenta de manera exponencial el riesgo de infección (Duncan y Wilkes 2005). Con relación a esto, se han reportado publicaciones, y en concreto, una, donde se expone que 4 receptores contrajeron una infección causada por la bacteria *Escherichia coli*-multirresistente en un centro de trasplantes (Kieslichova et al. 2019).

Así mismo, los pacientes que deben recibir diálisis para una enfermedad renal avanzada tienen mayor riesgo de infección; siendo esta, la segunda causa principal de muerte (Su et al. 2018). Y, por último, las personas que reciben quimioterapia tienen un elevado riesgo de contraer una infección durante el tratamiento, resultando una situación crítica para estos pacientes (Vento y Cainelli 2003).

De lo mencionado resulta necesario decir que numerosas organizaciones se han unido en un llamamiento para incrementar la inversión en el descubrimiento de antibióticos. Aparte de los medicamentos tradicionales de pequeñas moléculas, se han hecho recomendaciones para la investigación de terapias alternativas (Kållberg, Salvesen Blix, y Laxminarayan 2019). Luong, Thanh, y Tran, 2020, enfatizan que los péptidos antimicrobianos (AMPs, siglas en inglés) presentan una alternativa terapéutica prometedora que merece inversión e investigación (Luong, Thanh, y Tran 2020). Del mismo modo, recientes estudios han revelado que los AMPs forman una clase de antibióticos que tienen baja predisposición

de desarrollar resistencia (Mwangi et al. 2019). Paralelamente, los AMPs tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y proveen protección frente a bacterias, hongos, parásitos, virus, entre otros (Kang et al. 2017; Lei et al. 2019). Análogamente, investigaciones al respecto han evidenciado que desempeñan un papel adicional en la inflamación, inmunidad y cicatrización de una herida (Bahar y Ren 2013).

Por otra parte, se sabe que la piel de los anfibios es una de las fuentes más abundantes de péptidos antimicrobianos que existen (Casciaro et al. 2020; Patocka et al. 2019). Las secreciones cutáneas de las ranas representan un tesoro de estas pequeñas moléculas (Wang et al. 2016; Xu y Lai 2015), siendo Ecuador uno de los países con la mayor cantidad de anfibios (Amphibian Survivial Alliance 2023; American Museum of Natural History 2023). Se han podido identificar alrededor de 635 especies de anfibios nativos en el territorio ecuatoriano y se han estudiado especies de la familia Hylidae, *Agalychnis spurelli* (la rana árbol deslizante) y *Boana Picturata* (la colorida rana arbórea) y han descubierto 13 y 7 nuevos péptidos, respectivamente (Proaño-Bolaños et al. 2019).

Por ende, la finalidad de este trabajo de titulación es de examinar un péptido antimicrobiano nuevo, con la capacidad de inhibir patógenos de manera eficaz que ponen en sumo riesgo a la humanidad actual, como son: la *E. coli, S. aureus, C. freundii y C. albicans.*

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades fisicoquímicas, estructura secundaria y el mecanismo de acción del péptido *Picturina – 2* extraído de la secreción cutánea de la rana *Boana picturata* empleando métodos computacionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las propiedades fisicoquímicas de la Picturina – 2 mediante aproximaciones obtenidas por medio del empleo de servidores web.
- Definir la estructura secundaria más acertada de la Picturina – 2 mediante las predicciones obtenidas a partir de la utilización de servidores web.
- Construir la proyección molecular de la estructura secundaria más acertada de la Picturina – 2 usando el programa PyMOL.
- Establecer la conformación energéticamente más estable de la estructura secundaria para la Picturina – 2 mediante el modelado computacional y optimización geométrica por medio del programa Gaussian09.
- Establecer los valores del acoplamiento molecular entre la Picturina – 2 con las enzimas inhibitorias de patógenos y moléculas presentes en la membrana celular bacteriana por medio del programa Autodock Vina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron varios métodos computacionales y servidores web. Por ejemplo, para establecer las propiedades fisicoquímicas del péptido se empleó los servidores web Pepcalc y Bachem (BACHEM 2020; PepCalc 2020). De estos servidores se obtuvo el punto isoeléctrico, la carga neta a pH neutro y su hidrofilicidad promedio. En cambio, para definir la estructura secundaria del péptido más adecuada, el servidor Jpred fue el más preciso en cuanto a la identificación de estados conformacionales (Drozdetskiy et al. 2015). Con dicha información, se pudo ilustrar la molécula de manera tridimensional, con el programa Pymol (Lill y Danielson 2011). Posteriormente, se optimizó dicha estructura con el fin de encontrar la conformación energética más estable mediante el programa Gaussian09 (Frisch et al. 2016). El método y las bases empleadas en la optimización fueron el método híbrido ONIOM y el conjunto de bases HF/6-31-G. Por último, ya una vez teniendo la estructura optimizada, se ejecutó el acoplamiento molecular del péptido 2PIC con las siguientes macromoléculas: la enzima AmiA, enzima GyrB, enzima Exo-β-(1,3)-glucanasa, enzima proteasa aspártica secretada, enzima AmpD, las proteínas de porina de membrana externa OmpC y OmpF,y por último, las proteínas “Penicillin-binding protein 2a” y “Penicillin-binding1b”. Los parámetros para que se lleve a cabo el acoplamiento molecular fueron: tratamiento de la macromolécula y el ligando, la selección de la “grid box” y, por último, la configuración del archivo de configuración. El tratamiento de la macromolécula, consistió en eliminar los componentes no proteicos, la adición de átomos de hidrógeno de carácter polar, la reparación de átomos perdidos, la adición de cargas Kollman y su correcta distribución por toda la molécula. Teniendo esto se dispuso a definir el área de acoplamiento, lo cual, se denomina la selección de la “grid box”. Se empleo una técnica de acoplamiento a

ciegas o con su terminó en inglés “blind docking”, debido a que el péptido 2PIC carecía de literatura para poder saber los posibles sitios de enlace con los microorganismos utilizados. Finalmente se guardó el archivo en un formato pdbqt (formato del programa Autodock).

Para el tratamiento de ligando (péptido 2PIC), se obviaron la eliminación de los componentes no proteicos, sin embargo, los demás pasos básicos que se discutió en el tratamiento de la macromolécula, si se lo realizo. Además, se seleccionó las opciones “torsion tree” y “detect root”, y se guardó dicho archivo con un formato pdbqt. Una vez, con dichos archivos se llevó a cabo la configuración del archivo para ejecutar el programa AutodockVina (Trott y Olson 2010). El archivo de configuración tuvo la siguiente información: el nombre en que se guardó, tanto la macromolécula como el ligando, las coordenadas (x y z) de la “grid box” y su tamaño en cada coordenada, el archivo de salida en formato pdbqt y el archivo log en formato texto. Después del acoplamiento, con el archivo de salida (out.pdbqt) de cada caso, se lo visualizó en Pymol y se adjuntó como imagen la del mejor acoplamiento en la sección figuras. Finalmente, los valores de afinidad de cada acoplamiento realizado encontrados en el archivo log.txt, se adjuntó en una tabla de datos en la sección tablas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA PICTURINA - 2

La secuencia del péptido Picturina – 2 (2PIC) fue proporcionada por el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM. La secuencia de la 2PIC en código de tres letras es la siguiente: Gly – Val – Phe – Lys – Asp – Ala – Leu – Lys – Gln – Phe – Gly – Ala – Ala – Leu – Leu – Asp –Lys – Ala –Ala – Asn – Ala – Leu – Lys – Pro – Lys.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) se consideran como un primitivo mecanismo de defensa de las células eucariotas contra la invasión de patógenos (Zhang et al. 2021); donde las células eucariotas se reconocen por la presencia de un núcleo celular y generalmente se los puede encontrar en animales, plantas, algas, hongos, levaduras y protozoos (Gadd y Raven 2010). Esto se debe a las siguientes razones: (1) la producción de los AMPs requiere menos tiempo y energía en comparación de la síntesis de anticuerpos; (2) estas pequeñas moléculas alcanzan con mayor facilidad al patógeno en comparación a las inmunoglobulinas, y (3) algunas células eucariotas carecen de un sistema inmune a base de linfocitos, como es el caso, de los insectos, puesto que dependen principalmente de una serie de AMPs o compuestos antibacterianos para eliminar los microorganismos invasores (Diamond et al. 2009; Groisman 1994).

Los AMPs han evolucionado para actuar en contra de un amplio rango de patógenos en diferentes contextos fisiológicos (Papagianni 2003; Boman 1998; Lehrer y Ganz 1999). Dicha peculiaridad se respalda en sus propiedades fisicoquímicas, como, por ejemplo: el tamaño, la secuencia, la carga, el grado de

estructuración (helicidad), la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena y los ángulos obtenidos por la cara hidrofóbica e hidrofílica de la hélice formada (Giangaspero, Sandri, y Tossi 2001). Estos parámetros están intrínsecamente relacionados, por lo que modificar uno puede dar como resultado cambios significativos en los demás. Además, tener conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de un péptido es esencial para entender los modos de interacción con la membrana y en gran medida determina su modo de acción (Pirtskhalava et al. 2021).

En la Tabla 1 y 2 se muestran los valores de las propiedades fisicoquímicas del péptido 2PIC, que son muy similares entre los dos servidores Web. Se tiene como resultado un valor de carga neta a pH neutro de +3, debido a lo cual, nos lleva a inferir que la 2PIC tiene carácter catiónico, como la mayoría de AMPs en la naturaleza. Dicho carácter catiónico del péptido 2PIC impulsa la unión hacia las membranas bacterianas cargadas negativamente por atracción electrostática (Yin et al. 2012), dado que las membranas bacterianas predominantemente están compuestas por fosfatidilglicerol, cardiolipina o fosfatidilserina; compuestos que aportan en gran parte su densidad electrónica negativa (Huang, Huang, y Chen 2010; Silhavy, Kahne, y Walker 2010). Sin embargo, una alta carga catiónica puede resultar contraproducente, debido a que incrementa la actividad hemolítica (Greco et al. 2020). Y, por ejemplo, Jiang et.al., (2008) reportaron una alteración brusca en la actividad hemolítica al aumentar una sola carga positiva de +8 a +9 en la cara polar del péptido V13K (Jiang et al. 2008); sugiriendo un umbral crítico para la carga positiva neta. Por otra parte, favorecer la actividad hemolítica, se refiere a la destrucción de los glóbulos rojos, produciendo un aumento en los niveles de hemoglobina libre, lo que provoca anemia y estrés en los riñones y otros órganos (Hilburn 2014).

El próximo parámetro se trata del número de residuos, donde, por lo general, suele ser un número relativamente pequeño (<60 aa) (Kuroda, Caputo, y DeGrado 2009). Por lo que, el tamaño del péptido 2PIC hallado en la rana *Boana Picturata**,*** es completamente normal que sea de 25 aa. Dicho parámetro tiene una alta relación con la actividad antimicrobiana, ya que este varía según la longitud del péptido, puesto que se necesita que el péptido tenga la distancia suficiente para que pueda abarcar toda la bicapa lipídica para provocar un poro en la membrana bacteriana (Schmidt y Wong 2013); siendo el poro el resultado de la unión e inserción de los péptidos en la bicapa lipídica que conduce a la lisis celular (Brogden 2005).

De hecho, se ha estudiado que la disminución de la longitud del péptido provoca que tanto el efecto antimicrobiano como la permeabilidad de la membrana disminuyan (Malanovic y Lohner 2016). Esto se debe a que la unión de los AMPs a las membranas se vuelve más forzada, ya que, al disminuir la longitud del péptido, aumenta la penalización de entropía o "*entropy penalty*", por aminoácido, en la adsorción (Malmsten 2014); es decir, la solvatación hidrofóbica de los AMPs a temperatura ambiente corresponde a un gran valor de entropía negativa, lo cual no ocurrirá espontáneamente. En otras palabras, la capacidad de ruptura de membrana que los AMPs poseen, disminuyen cuando sus longitudes se vuelven lo suficientemente cortas (Hasan et al. 2019). Asimismo, dicha disminución de la longitud del péptido favorece a que los AMPs no sean susceptibles a la degradación por proteasas bacterianas y humanas (Kim et al. 2014; Vlieghe et al. 2010). De hecho, es probable que esta sea la causa más importante de la pobre actividad in vivo de algunos AMPs naturales (Chen y Lu 2020).

Por consecuencia del anterior parámetro el péptido 2PIC cuenta con un peso molecular corto y es <10 kDa (Reddy, Yedery, y Aranha 2004). Dicho rango de peso

molecular nos permite crear una simbiosis entre antibióticos convencionales y los AMPs, logrando así un tratamiento más efectivo y selectivo (Ruden et al. 2019).

Como siguiente parámetro tenemos el punto isoeléctrico de los AMPs, donde, este suele oscilar cerca de 10 (Talapko et al. 2022). Consistente con el resultado con los servidores web PepCalc y Bachem de 10,53 y 10,41, respectivamente. Esta propiedad es fundamental para la correcta solubilidad de los péptidos, ya que cuando el pH de un solvente es igual al punto isoeléctrico (PI) del péptido, tiende a precipitar y perder su función biológica (Shaw et al. 2001). Por otro lado, la sangre humana suele oscilar en un rango de 7,35 a 7,45 de pH (Dries y Marini 2009), según lo cual, el pH no debería interferir en la función biológica del péptido.

Como ya se ha evidenciado, el pH es un parámetro muy relevante, ya que se ha demostrado que algunos péptidos ricos en histidina son dependientes del pH, donde sus actividades antimicrobianas se inhiben por encima del logaritmo negativo de la constante de disociación (pKa) de la histidina (≈6,0), y es restaurado a condiciones ácidas (pH 5,5) (Kacprzyk et al. 2007).

Continuando con el siguiente parámetro, tenemos la hidrofobicidad o la anfipaticidad. El péptido 2PIC tiene un valor de hidrofobicidad (<h>) de 0,275 y un momento hidrofóbico (<μh>) de 0,309; siendo este, un valor numérico que funciona como medida de anfipaticidad (HeliQuest 2022). Estos parámetros son cruciales en la penetración de las membranas celulares, debido a que la membrana celular es de naturaleza anfipática, constituida por fosfolípidos, por lo general, con una parte hidrofóbica interna, encerrada por dos capas interfaciales polares enriquecidas con agua en contacto con el entorno intracelular y extracelular (Takechi-Haraya et al. 2022; Lombard 2014). Por lo que, los compuestos que pueden asociarse, incrustarse

o penetrar en la membrana deben ser hidrofóbicos o anfipáticos. La Figura 1, muestra de forma visual estas caras. La cara hidrofóbica está conformada por los aminoácidos Phe – Phe – Ala – Leu y la cara hidrofílica por los aportes de Lys, dando como resultado un porcentaje de residuos no polares del 56 %, que incita a la formación de una estructura anfipática al interactuar con las demás células, frente al 44 % del aporte de los residuos polares (HeliQuest 2022). En simples palabras, se puede decir, que a mayor hidrofobicidad de un péptido anfipático α-helicoidal, mayor su actividad antimicrobiana (Zhang et al. 2022). No obstante, deberá estar comprendida en una ventana óptima de hidrofobicidad en donde convergen una alta actividad antimicrobiana y baja actividad hemolítica (Chen et al. 2007).

Las propiedades fisicoquímicas determinan la bioactividad de los AMPs, por lo que, es oportuno comparar dichos resultados, comparándolos con péptidos estándares como, por ejemplo, la Magainina – 2 o Buforina – 2b, de los, que están bien establecidas sus actividades biológicas, propiedades fisicoquímicas, estructuras y modos de acción, para de una forma contemplar la eficiencia del péptido 2PIC como inhibidor antimicrobiano (Wang et al. 2011; Imura, Choda, y Matsuzaki 2008). En la Tabla 2 se muestra que tanto el péptido 2PIC como los péptidos estándar, comparten similares porcentajes de hidrofobicidad. Pero, en la Tabla 3**,** donde se comparan las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs), nos indica que desafortunadamente nuestro péptido de estudio presenta una actividad biológica muy pobre frente a patógenos similares, considerando que los valores más bajos de MICs, indican que se requiere menos medicamento para inhibir el crecimiento del organismo. Por lo tanto, la Magainina – 2 y la Buforina – 2, son agentes antimicrobianos más efectivos que el péptido de estudio.

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PICTURINA - 2

La predicción de la estructura de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos es uno de los problemas más importantes de la biología molecular (Deng, Jia, y Zhang 2018). Por ser una secuencia nueva, evidentemente, todavía no se encuentra en la base de datos de la “Protein data bank”, ya que, para poder ser incluida en esta, se deben de hacer mediciones experimentales para obtener la estructura tridimensional de la secuencia. Dichas mediciones experimentales consisten en cristalografía de rayos-X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y técnicas de microscopía electrónica. Sin embargo, estas técnicas experimentales requieren mucho tiempo, son costosas y complejas. Como resultado, se han desarrollado algoritmos computacionales y, tanto el conocimiento teórico de la estructura, la dinámica y el plegamiento de las proteínas se han utilizado para generar un modelo a partir de las secuencias de aminoácidos. Por lo general, se realizan mediciones experimentales cuando la molécula ha superado las expectativas, para justificar dicha intervención experimental (Agnihotry et al. 2022).

El conocimiento de la estructura secundaria es un paso intermedio esencial hacia la predicción de la estructura tridimensional. Además, en dicha agrupación la proteína recién puede desempeñar sus funciones biológicas (Yang et al. 2022).

Los elementos fundamentales de la estructura secundaria de proteínas son α-hélice, hoja β, “*coils*” y “*turns*”, pero tanto las α-hélice y hoja β son los dos tipos principales más recurrentes (Gromiha 2010). La mayoría de los AMPs adoptan una estructura α-helicoidal ideal (rotación de 100˚ por residuo) (Xiong et al. 2015), de modo que, existen varios métodos de predicción de la estructura secundaria de proteínas, donde a cada residuo de una secuencia se le asigna un estado conformacional, ya sea (H) “*α-helix*”, (T) “*β-turns*”, (E) “*extended β-strand*” o (C) “coil”

(Ma, Liu, y Cheng 2018). Los servidores web más ampliamente usados son JPred, PSIPRED y PredictProtein (Drozdetskiy et al. 2015). Teniendo JPred una precisión reportada de 81,5 % (Cole, Barber, y Barton 2008), PSIPRED, 81,6 % (Buchan et al. 2010) y PredictProtein, 76,0 % (Rost y Liu 2003). Sin embargo, para este estudio, de los 3 servidores de predicción, se empleó 2 de ellos, Jpred y PredictProtein, ya que, PSIPRED, no admitió una secuencia demasiada corta. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 2 y 3. En compensación, se usaron los siguientes algoritmos: GOR4 y I-TASSER; teniendo el método I-TASSER un valor de precisión de 81,0 % (Zhang 2008) y el método GOR en su última versión (GOR V) un valor de 73,5 % (Sen et al. 2005). Los resultados se presentan en la Figuras 4 y 5.

Es notable señalar que existen otros métodos de predicción en base a "*Deep Neural Network*" o "*Database lookup*" que alcanzan una mayor precisión, teniendo valores entre 84 –92 %, por ejemplo, Frag1D, SSpro5, SPIDER2 y Raptor X Property (Tang et al. 2011). Pero como ya se mencionó anteriormente no pudieron, ser incluidos en este estudio, ya que la mayoría de estos métodos no aceptaban una secuencia con menos de 26 residuos.

El método Jpred predice la estructura secundaria de la secuencia dada, usando métodos de alineación de secuencias múltiples por medio de un perfil HMM y PSIBLAST (Jones 1999). Por este motivo, cuenta con el porcentaje de precisión más alto de los métodos empleados. Se ha decidido confiar en la predicción de la estructura secundaria que proporciona este método. Sin embargo, cabe mencionar que todos los modelos de predicción en su mayoría acertaron en la cantidad de α-hélices, aunque hubo una ligera diferencia entre la cantidad de "*random coils*". En especial, tanto el método PredictProtein e I-TASSER, concordaron relativamente en todo a lo que se refiere a los estados conformacionales.

Adicionalmente, se va a explicar los estados conformacionales presentes en esta secuencia, comenzando con las α-hélices. Este se conforma y se mantiene por medio de interacciones de la red central al eje primario de la hélice. Estas interacciones son puentes de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo y el nitrógeno del grupo amino siguiendo el siguiente patrón i^{th} y $i + 4^{th}$ (Banerjee, Radvar, y Azevedo 2018). La estabilidad de las α-hélices depende del número de aminoácidos involucrados en las interacciones del eje y la propensión helicoidal de cada aminoácido (Fujiwara, Toda, y Ikeguchi 2012).

Todos los demás residuos que no participan en α-hélices y hojas-β a menudo se categorizan como “otros”; de ahí que en el método PredictProtein lo menciona. Dicho grupo se categoriza en “random coils” (Skipper 2005). Estos son regiones que la cadena proteica que no forman una estructura secundaria regular y no se caracterizan por ningún patrón regular de puentes de hidrógeno. Se encuentran en dos ubicaciones en las proteínas: en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal de la proteína (Marcelino y Gierasch 2008).

CONSTRUCCIÓN MOLECULAR DE LA PICTURINA – 2 MEDIANTE EL USO DE SOFTWARE PYMOL

PyMOL es un sistema de visualización molecular de código abierto, escrito en Python, que permite la visualización en tiempo real de todo tipo de moléculas. Asimismo, puede producir animaciones e imágenes de alta calidad de macromoléculas para publicaciones científicas en diferentes representaciones incluidas, “*ribbons*”, “*cartoons*”, “*dots*”, “*surfaces*”, “*spheres*”, “*sticks*”, “*mesh*” and “*lines*” (Lill y Danielson 2011).

Con la ayuda de la información del servidor web JPred, se pudo construir el péptido 2PIC de forma tridimensional y se puede observar en la Figura 6.

OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA Y MINIMIZACIÓN ENERGÉTICA MEDIANTE EL USO DEL SOFTWARE GAUSSIAN09

El objetivo del refinamiento es mejorar el modelo predicho de manera que tenga las orientaciones precisas de la cadena lateral y alta calidad estereoquímica para que pueda parecerse a la estructura nativa (Feig 2017; Jabeen, Mohamedali, y Ranganathan 2019). Para el refinamiento tenemos dos estrategias, tanto la optimización estructural, como la minimización de energía potencial. De hecho, la optimización estructural, sirve para mejorar los elementos de la estructura secundaria y las redes de puentes de hidrógeno. Mientras que la minimización energética es esencial para determinar la disposición molecular adecuada en el espacio (Sasidharan y Saudagar 2022). El resultado de la optimización nos dará la conformación más estable (es decir, la molécula en su estado global de energía mínima) o, en otras palabras, la conformación bioactiva.

Para dicho proceso, se hizo el uso del programa Gaussian09 (Frisch et al. 2016) y se puede evidenciar en la Figura 7 la estructura optimizada del péptido 2PIC. Por otro lado, la meta de la minimización de energía es conseguir el mínimo global. Teóricamente, es fácil definirlo, es decir, todas las derivadas de la función son cero y la matriz de la segunda derivada debe ser positiva; pero en la práctica, existen dificultades para conseguirlo, ya que hay varios mínimos locales en los que las fuerzas interatómicas netas de todos los átomos son cero, y es complejo establecer un mínimo real (Sasidharan y Saudagar 2022). Más exactamente, para este procedimiento y en la vasta mayoría de trabajos computacionales se emplean métodos tales como, campo autoconsistente (SCF, siglas en inglés) y Hartree-Fock

(Kussmann, Beer, y Ochsenfeld 2013). Para obtener la estructura optimizada se tuvo que ejecutar el programa Gaussian por 4 intentos, en vista de que no se encontraba un punto de convergencia y los ciclos de cálculo no eran suficientes para obtener el mínimo global. A pesar de todo, en el cuarto intento, y después de 60 repeticiones del cálculo, se obtuvo la optimización geométrica.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR CON ENZIMAS INHIBITORIAS MEDIATE EL PROGRAMA AUTODOCK VINA

El acoplamiento molecular o más conocido con el término "*molecular docking*", es una rama muy importante en el diseño computacional de fármacos y la bioinformática (Zhang et al. 2022). En pocas palabras, el "*molecular docking*" es un procedimiento computacional que intenta predecir la fuerza de unión no covalente entre una macromolécula (receptor) y un ligando (molécula pequeña) y los mejores arreglos geométricos (Meng et al. 2011).

Comprendemos como unión no covalente a los puentes de hidrógeno, los enlaces iónicos y las fuerzas de Van der Waals (Johnson et al. 2010). Sin embargo, en la última década ha aumentado el interés en las interacciones de otra clase de macromoléculas, ya sea, ácidos nucleicos (DNA y RNA), enzimas, ligandos como sustratos, inhibidores u otros candidatos a fármacos (Salo-Ahen et al. 2020). Generalmente, este procedimiento computacional es usado para predecir la interacción del complejo proteína-ligando, de este modo, por ejemplo, se pudo saber la interacción entre el medicamento salbutamol y las células bronquiales. Consistiendo en que las células que se encuentran en la tráquea tienen receptores denominados receptores adrenérgicos β-2 (Bandaru et al. 2017). Estos son capaces de detectar la molécula del salbutamol, y generar una respuesta celular, provocando

una dilatación de los bronquios de los pulmones, desencadenando que el paciente con asma consiga respirar (Hikino et al. 2019).

En cambio, en el presente estudio se comprobará la capacidad del péptido antimicrobiano 2PIC de acoplarse a sitios claves de vulnerabilidad de los diferentes microorganismos. Por ejemplo, para el *Staphylococcus aureus*, se escogieron a la enzima acetylmuramyl-L-alanina amidasa (AmiA; EC 3.5.1.28; PDB: 4KNL) y "penicillin-binding protein 2a" (PDB: 1MWT). Para el microorganismo *Escherichia coli*, se escogieron la enzima ADN girasa subunidad B (GyrB; EC 5.6.2.2; PDB: 4PRV) y "penicillin-binding Protein 1b" (PDB: 3VMA). En cambio, para el microorganismo *Candida Albicans*, se escogieron las enzimas Exo-β-(1,3)-glucanasa (EC 3.2.1.58; PDB: 1EQC) y la proteasa aspártica secretada (PAS, siglas en inglés; EC 3.4.23.24; PDB: 1EAG). Por último, para el microorganismo *Citrobacter Freundii,* se eligieron las proteínas de membrana externa OmpC (PDB: 7JZ3), OmpF (PDB: 6WTZ), y la enzima AmpD (PDB: 1J3G).

Las razones de la elección de las mencionadas enzimas o proteínas, se debe a que, en dichos sitios, de alguna manera, los microorganismos de estudio son vulnerables, de manera que pierden su capacidad patógena. Empezando, con la enzima AmiA, que tiene la capacidad de romper el enlace entre el carbohidrato y los restos peptídicos de peptidoglicano (PGN, siglas en inglés)(Büttner et al. 2014). El exoesqueleto de PGN es, el principal componente que comparten todas las envolturas de las células bacterianas, lo que se compone de unidades repetitivas del disacárido N-acetilglucosamina-N-acetilácido murámico, que están entrecruzadas por cadenas laterales de pentapéptidos (Humann y Lenz 2009). De ahí que, el componente PGN sea esencial para estabilizar la membrana celular frente a la presión osmótica intracelular, asimismo, permite a las células bacterias sobrevivir en diferentes

ambientes y es primordial para el crecimiento, división, viabilidad celular, y, por ende, no permite una autolisis celular (Delaune et al. 2011).

Por otro lado, la enzima “penicillin-binding protein 2a” fue elegida, puesto que, en la gran mayoría de los casos, es el objetivo ideal de los tratamientos que se tienen actualmente. De ahí que, tenemos los llamados antibióticos β-lactámicos, que constituyen el 60 % de los antibióticos que se emplean a nivel mundial (Bush y Bradford 2016). En general, la inhibición de los “penicilling-binding proteins” (PBPs siglas en inglés) por parte de los antibióticos β-lactámicos da como resultado una pared celular debilitada, y finalmente, lisis y muerte celular (Lim y Strynadka 2002); debido a que los PBPs catalizan la polimerización de biosíntesis del exoesqueleto de peptidoglicano (McPherson y Popham 2003).

La enzima ADN girasa subunidad B, fue elegida debido a que, si se interviene en las funciones que realiza dicha enzima, se previene el crecimiento bacteriano. Esto se debe a que esta enzima juega un rol muy importante en la replicación del ADN en numerosas especies gramnegativas, entre ellas, la *E. coli* (Gross et al. 2003; Jaktaji y Mohiti 2010). En cambio, la “Penicillin-binding Protein 1b” fue seleccionada, en virtud de que participa en la síntesis de la pared celular; siendo el mayor objetivo de los antibióticos β-lactámicos (Macheboeuf et al. 2006). La enzima, Exo-β-(1,3)-glucanasa, fue elegida, dado que interfiere en la funcionalidad de la enzima β-1,3-glucano mediante la hidrólisis del glucano, cortando secuencialmente los residuos de glucosa en el extremo no reductor, y por lo cual, se tiene como producto principal a la glucosa libre (Wu et al. 2021). De ahí que, la enzima β-1,3-glucano es un componente integral en la pared celular fúngica y el debilitamiento de esta daría como resultado la ruptura de la integridad celular y, en última instancia, la lisis celular (Mouyna, Hartl, y Latgé 2013).

Asimismo, la enzima proteasa aspártica secretada fue elegida, en vista que muchos estudios han comprobado que actúa como factor de virulencia, por lo que, las variantes deficientes en PAS son menos virulentas, siendo el sitio de acción ideal (Koelsch et al. 2000; Naglik, Challacombe, y Hube 2003). Por último, tenemos que discutir sobre la elección de OmpC y OmpF, donde para esto, primero hay que entender que todas las bacterias gramnegativas secretan estructuras de bicapa de membrana esférica (de entre 10 a 250 nm), denominadas vesículas de membrana externa (OMVs, siglas en inglés). Los OMVs consisten en proteínas de la membrana externa, proteínas citoplasmáticas, proteínas de la membrana periplásmica, fosfolípidos, lipopolisacáridos y material genético (Schwechheimer y Kuehn 2015). Recientemente, se ha demostrado que las proteínas de porina (OmpC y OmpF) y las enzimas β-lactamasas son más abundantes en donde la *E. Coli* es resistente a los antibióticos β-lactámicos que cuando es susceptible a dichos antibióticos (Khalifa et al. 2021). Esto sugiere afirmar que, la ausencia de las porinas influye drásticamente en que las bacterias no puedan presentar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos β-lactámicos (Kim et al. 2020). Por lo que, la ausencia de estas la vuelven vulnerables a todo tipo de moléculas antimicrobianas. De igual manera, muchos estudios han demostrado que las OMVs sirven como defensa frente a péptidos antimicrobianos y antibióticos.

Y, por último, la enzima amidasa AmpD fue elegida, debido a que tiene la capacidad de producir un precursor de la pared celular bacteriana, lo cual, si uno interfiera en dicho proceso, puede debilitar la parde celular (Johnson, Fisher, y Mobashery 2013). Como se puede evidenciar en la Tabla 4 todos los complejos formados entre las diferentes macromoléculas (enzimas) y el ligando (2PIC) ocurren de manera espontánea, debido a que los valores de “free energy binding” son

menores a cero. Dichos valores representan la suma total de las energías intermoleculares, por lo que no podemos deducir qué tipo de interacciones no covalentes específicas se produjeron entre el péptido 2PIC y las respectivas enzimas o proteínas (Hata et al. 2021). No obstante, dichos valores son esenciales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el momento de encontrar ligandos moleculares capaces de inhibir o activar un objetivo específico de una proteína a través del enlazamiento del ligando (Hughes et al. 2011). No obstante, se puede destacar de manera visual dichas interacciones desde la Figura 8 a la Figura 11.

Por otro lado, la finalidad macro de estas técnicas computacionales enfocadas en el diseño de fármacos suelen llevarse a cabo por la inclusión de una serie de pasos, por lo que, con los resultados del “docking” obtenidos podemos dar seguimiento a otro método computacional llamado “Molecular Dynamics” (MD, por sus siglas en inglés) (Yu y Mackerell 2017). Este es un método que considera todas las moléculas siendo, una de ellas, el agua, puesto que las proteínas en la naturaleza (disueltas mayormente en agua) son altamente dinámicas (Durrant y McCammon 2011). De hecho, en algunos casos el agua puede actuar como centro nucleofílico para que se lleve a cabo una catálisis enzimática o puede ayudar en el plegamiento de las proteínas, entre otras cosas. Siendo así, la inclusión de las moléculas de agua durante las simulaciones abre vías de unión ocultas, permitiendo que las cadenas laterales de los aminoácidos se muevan libremente (Bellissent-Funel et al. 2016).

CONCLUSIONES

Para concluir se puede rescatar que el péptido Picturina — 2 comparte propiedades fisicoquímicas similares con los péptidos antimicrobianos que se encuentran en la naturaleza, al igual que su estructura α helicoidal. Esto ayuda de gran manera a entender el mecanismo de acción que tendrá el péptido frente a membranas bacterianas. De igual manera, saber que el péptido presenta una alta afinidad con las siguientes moléculas: N-acetilmuramoil-L-analina amidasa, subunidad B de la ADN girasa, porina F de la membrana externa, proteinasa aspártica secretada nos ayudará para las siguientes técnicas enfocadas a los fármacos asistido por computadora, como la simulación de dinámica molecular y fases más posteriores como las fases preclínicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnihotry, Shikha, Rajesh Kumar Pathak, Dev Bukhsh Singh, Apoorv Tiwari, y Imran Hussain. 2022. "Chapter 11 - Protein Structure Prediction". Pp. 177–88 en *Bioinformatics: Methods and Applications*. Academic Press.

American Museum of Natural History. 2023. "Amphibian Species of the World". Recuperado el 27 de enero de 2023 (https://amphibiansoftheworld.amnh.org/).

Amphibian Survivial Alliance. 2023. "AmphibiaWeb | Home". Recuperado el 27 de enero de 2023 (https://amphibiaweb.org/).

BACHEM. 2020. "Peptide Calculator". Recuperado el 1 de febrero de 2023 (https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/).

Bahar, Ali Adem, y Dacheng Ren. 2013. "Antimicrobial Peptides". *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 6(12):1543–75. doi: 10.3390/PH6121543.

Bandaru, Srinivas, Mallika Alvala, Anuraj Nayarisseri, Saphy Sharda, Himshikha Goud, Hema Prasad Mundluru, y Sanjeev Kumar Singh. 2017. "Molecular Dynamic Simulations Reveal Suboptimal Binding of Salbutamol in T164I Variant of B2 Adrenergic Receptor". *PLoS ONE* 12(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0186666.

Banerjee, J., E. Radvar, y H. S. Azevedo. 2018. "Chapter 1 - Self-Assembling Peptides and Their Application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine". Pp. 245–81 en *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*. Woodhead Publishing.

Bellissent-Funel, Marie Claire, Ali Hassanali, Martina Havenith, Richard Henchman, Peter Pohl, Fabio Sterpone, David van der Spoel, Yao Xu, y Angel E. Garcia. 2016. "Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins". *Chemical Reviews* 116(13):7673. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00664.

Boman, H. G. 1998. "Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review". *Scandinavian Journal of Immunology* 48(1):15–25. doi: 10.1046/J.1365-3083.1998.00343.X.

Brogden, Kim A. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nature Reviews. Microbiology* 3(3):238–50. doi: 10.1038/NRMICRO1098.

Buchan, D. W. A., S. M. Ward, A. E. Lobley, T. C. O. Nugent, K. Bryson, y D. T. Jones. 2010. "Protein Annotation and Modelling Servers at University College London". *Nucleic Acids Research* 38(Web Server issue). doi: 10.1093/NAR/GKQ427.

Burnett-Boothroyd, S. C., y B. J. McCarthy. 2011. "Antimicrobial Treatments of Textiles for Hygiene and Infection Control Applications: An Industrial Perspective". *Textiles for Hygiene and Infection Control* 196–209. doi: 10.1533/9780857093707.3.196.

Bush, Karen, y Patricia A. Bradford. 2016. "β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(8). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A025247.

Büttner, Felix Michael, Sebastian Zoll, Mulugeta Nega, Friedrich Götz, y Thilo Stehle. 2014. "Structure-Function Analysis of Staphylococcus Aureus Amidase Reveals the Determinants of

Peptidoglycan Recognition and Cleavage". *The Journal of Biological Chemistry* 289(16):11083–94. doi: 10.1074/JBC.M114.557306.

Casciaro, Bruno, Floriana Cappiello, Maria Rosa Loffredo, Francesca Ghirga, y Maria Luisa Mangoni. 2020. "The Potential of Frog Skin Peptides for Anti-Infective Therapies: The Case of Esculentin-1a(1-21)NH2". *Current Medicinal Chemistry* 27(9):1405–19. doi: 10.2174/0929867326666190722095408.

Casqueiro, Juliana, Janine Casqueiro, y Cresio Alves. 2012. "Infections in Patients with Diabetes Mellitus: A Review of Pathogenesis". *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16:27–36. doi: 10.4103/2230-8210.94253.

CDC. 2020a. "Antibiotic - Antimicrobial Resistance". Recuperado el 17 de enero de 2023 (https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html).

CDC. 2020b. "Antibiotic-Resistant Infections Threaten Modern Medicine". Recuperado el 27 de enero de 2023 (https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/Threat-Modern-Medicine-508.pdf).

Chen, Charles H., y Timothy K. Lu. 2020. "Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications". *Antibiotics* 9(1). doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9010024.

Chen, Yuxin, Michael T. Guarnieri, Adriana I. Vasil, Michael L. Vasil, Colin T. Mant, y Robert S. Hodges. 2007. "Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α-Helical Antimicrobial Peptides". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(4):1398. doi: 10.1128/AAC.00925-06.

Cole, Christian, Jonathan D. Barber, y Geoffrey J. Barton. 2008. "The Jpred 3 Secondary Structure Prediction Server". *Nucleic Acids Research* 36(Web Server issue). doi: 10.1093/NAR/GKN238.

Delaune, Aurelia, Olivier Poupel, Adeline Mallet, Yves Marie Coic, Tarek Msadek, y Sarah Dubrac. 2011. "Peptidoglycan Crosslinking Relaxation Plays an Important Role in Staphylococcus Aureus WalKR-Dependent Cell Viability". *PLOS ONE* 6(2):e17054. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0017054.

Deng, Haiyou, Ya Jia, y Yang Zhang. 2018. "Protein Structure Prediction". *International Journal of Modern Physics. B* 32(18). doi: 10.1142/S021797921840009X.

Diamond, Gill, Nicholas Beckloff, Aaron Weinberg, y Kevin O. Kisich. 2009. "The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense". *Current Pharmaceutical Design* 15(21):2377. doi: 10.2174/138161209788682325.

Dries, David J., y John J. Marini. 2009. "Chapter 4 - Mechanical Ventilation". Pp. 22–31 en *Critical Care Nephrology*. Vol. 1. W.B. Saunders.

Drozdetskiy, Alexey, Christian Cole, James Procter, y Geoffrey J. Barton. 2015. "JPred4: A Protein Secondary Structure Prediction Server". *Nucleic Acids Research* 43(Web Server issue):W389. doi: 10.1093/NAR/GKV332.

van Duin, David, y David L. Paterson. 2016. "Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned". *Infectious Disease Clinics of North America* 30(2):377–90. doi: 10.1016/J.IDC.2016.02.004.

Duncan, Michael D., y David S. Wilkes. 2005. “Transplant-Related Immunosuppression: A Review of Immunosuppression and Pulmonary Infections”. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(5):449–55. doi: 10.1513/PATS.200507-073JS.

Durrant, Jacob D., y J. Andrew McCammon. 2011. “Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery”. *BMC Biology* 9(1):1–9. doi: 10.1186/1741-7007-9-71/FIGURES/4.

Feig, Michael. 2017. “Computational Protein Structure Refinement: Almost There, yet Still so Far to Go”. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 7(3):e1307. doi: 10.1002/WCMS.1307.

Friedman, N. D., E. Temkin, y Y. Carmeli. 2016. “The Negative Impact of Antibiotic Resistance”. *Clinical Microbiology and Infection* 22(5):416–22. doi: 10.1016/J.CMI.2015.12.002.

Frisch, M. J., G. w Trucks, H. B. Schlegel, G, E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnemberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A, Jr Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K, N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. W. Raghavachari, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. v Ortiz, J. Cioslowski, y D. J. Fox. 2016. “Gaussian 09, Revisión A.02 Gaussian, Inc., Wallingford CT”.

Fujiwara, Kazuo, Hiromi Toda, y Masamichi Ikeguchi. 2012. “Dependence of α-Helical and β-Sheet Amino Acid Propensities on the Overall Protein Fold Type”. *BMC Structural Biology* 12:18. doi: 10.1186/1472-6807-12-18.

Gadd, Geoffrey M., y John A. Raven. 2010. “Geomicrobiology of Eukaryotic Microorganisms”. *Https://Doi.Org/10.1080/01490451003703006* 27(6–7):491–519. doi: 10.1080/01490451003703006.

Giangaspero, Anna, Luca Sandri, y Alessandro Tossi. 2001. “Amphipathic α Helical Antimicrobial Peptides.” *European Journal of Biochemistry* 268(21):5589–5600. doi: 10.1046/J.1432-1033.2001.02494.X.

Greco, Ines, Natalia Molchanova, Elin Holmedal, Håvard Jenssen, Bernard D. Hummel, Jeffrey L. Watts, Joakim Håkansson, Paul R. Hansen, y Johan Svenson. 2020. “Correlation between Hemolytic Activity, Cytotoxicity and Systemic in Vivo Toxicity of Synthetic Antimicrobial Peptides”. *Scientific Reports* 10(1). doi: 10.1038/S41598-020-69995-9.

Groisman, Eduardo A. 1994. “How Bacteria Resist Killing by Host-Defense Peptides”. *Trends in Microbiology* 2(11):444–49. doi: 10.1016/0966-842X(94)90802-8.

Gromiha, M. Michael. 2010. “Chapter 1 - Proteins”. *Protein Bioinformatics* 1–27. doi: 10.1016/B978-8-1312-2297-3.50001-1.

Gross, Christian H., Jonathan D. Parsons, Trudy H. Grossman, Paul S. Charifson, Steven Bellon, James Jernee, Maureen Dwyer, Stephen P. Chambers, William Markland, Martyn Botfield, y Scott A. Raybuck. 2003. “Active-Site Residues of Escherichia Coli DNA Gyrase Required in Coupling ATP Hydrolysis to DNA Supercoiling and Amino Acid Substitutions Leading to Novobiocin Resistance”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3):1037. doi: 10.1128/AAC.47.3.1037-1046.2003.

Hasan, Moynul, Md Mizanur Rahman Moghal, Samiron Kumar Saha, y Masahito Yamazaki. 2019. "The Role of Membrane Tension in the Action of Antimicrobial Peptides and Cell-Penetrating Peptides in Biomembranes". *Biophysical Reviews* 11(3):431. doi: 10.1007/S12551-019-00542-1.

Hata, Hiroaki, Duy Phuoc Tran, Mohamed Marzouk Sobeh, Akio Kitao, y Mohamed Marzouk Sobeh. 2021. "Binding Free Energy of Protein/Ligand Complexes Calculated Using Dissociation Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics and Markov State Model". *Biophysics and Physicobiology* 18:305. doi: 10.2142/BIOPHYSICO.BPPB-V18.037.

HeliQuest. 2022. "HeliQuest ComputParam Form Version3". Recuperado el 28 de enero de 2023 (https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py).

Hikino, Keiko, Shinobu Kobayashi, Erika Ota, Taisei Mushiroda, y Tohru Kobayashi. 2019. "The Influence of Beta-2 Adrenergic Receptor Gene Polymorphisms on Albuterol Therapy for Patients With Asthma: Protocol for a Systematic Review and Meta-Analysis". *JMIR Research Protocols* 8(9). doi: 10.2196/14759.

Hilburn, M. E. 2014. *Encyclopedia of Toxicology*. editado por Philip Wexler. Elsevier.

Hotchkiss, Richard S., Lyle L. Moldawer, Steven M. Opal, Konrad Reinhart, Isaiah R. Turnbull, y Jean Louis Vincent. 2016. "Sepsis and Septic Shock". *Nature Reviews Disease Primers 2016 2:1* 2(1):1–21. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.

Huan, Yuchen, Qing Kong, Haijin Mou, y Huaxi Yi. 2020. "Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields". *Frontiers in Microbiology* 11. doi: 10.3389/FMICB.2020.582779.

Huang, Yibing, Jinfeng Huang, y Yuxin Chen. 2010. "Alpha-Helical Cationic Antimicrobial Peptides: Relationships of Structure and Function". *Protein & Cell* 1(2):143–52. doi: 10.1007/S13238-010-0004-3.

Hughes, J. P., S. S. Rees, S. B. Kalindjian, y K. L. Philpott. 2011. "Principles of Early Drug Discovery". *British Journal of Pharmacology* 162(6):1239. doi: 10.1111/J.1476-5381.2010.01127.X.

Humann, Jessica, y Laurel L. Lenz. 2009. "Bacterial Peptidoglycan-Degrading Enzymes and Their Impact on Host Muropeptide Detection". *Journal of Innate Immunity* 1(2):88. doi: 10.1159/000181181.

Imura, Yuichi, Naoki Choda, y Katsumi Matsuzaki. 2008. "Magainin 2 in Action: Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living Bacterial and Mammalian Cells". *Biophysical Journal* 95(12):5757. doi: 10.1529/BIOPHYSJ.108.133488.

Jabeen, Amara, Abidali Mohamedali, y Shoba Ranganathan. 2019. "Protocol for Protein Structure Modelling". *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* 1–3:252–72. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20477-9.

Jaktaji, Razieh Pourahmad, y Ehsan Mohiti. 2010. "Study of Mutations in the DNA Gyrase GyrA Gene of Escherichia Coli". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 9(1):43.

Jiang, Ziqing, Adriana I. Vasil, John D. Hale, Robert E. W. Hancock, Michael L. Vasil, y Robert S. Hodges. 2008. "Effects of Net Charge and the Number of Positively Charged Residues on the Biological Activity of Amphipathic Alpha-Helical Cationic Antimicrobial Peptides". *Biopolymers* 90(3):369–83. doi: 10.1002/BIP.20911.

Johnson, Erin R., Shahar Keinan, Paula Mori-Sánchez, Julia Contreras-García, Aron J. Cohen, y Weitao Yang. 2010. “Revealing Noncovalent Interactions”. *Journal of the American Chemical Society* 132(18):6498–6506. doi: 10.1021/JA100936W/SUPPL_FILE/JA100936W_SI_002.PDF.

Johnson, Jarrod W., Jed F. Fisher, y Shahriar Mobashery. 2013. “Bacterial Cell-Wall Recycling”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277(1):54. doi: 10.1111/J.1749-6632.2012.06813.X.

Jones, David T. 1999. “Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-Specific Scoring Matrices”. *Journal of Molecular Biology* 292(2):195–202. doi: 10.1006/JMBI.1999.3091.

Kacprzyk, Lukasz, Victoria Rydengård, Matthias Mörgelin, Mina Davoudi, Mukesh Pasupuleti, Martin Malmsten, y Artur Schmidtchen. 2007. “Antimicrobial Activity of Histidine-Rich Peptides Is Dependent on Acidic Conditions”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(11):2667–80. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2007.06.020.

Kållberg, Cecilia, Hege Salvesen Blix, y Ramanan Laxminarayan. 2019. “Challenges in Antibiotic R&D Calling for a Global Strategy Considering Both Short- and Long-Term Solutions”. *ACS Infectious Diseases* 5(8):1265–68. doi: 10.1021/ACSINFECDIS.9B00076.

Kang, Hee Kyoung, Cheolmin Kim, Chang Ho Seo, y Yoonkyung Park. 2017. “The Therapeutic Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): A Patent Review”. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 55(1). doi: 10.1007/S12275-017-6452-1.

Khalifa, Sara M., Abeer M. Abd El-Aziz, Ramadan Hassan, y Eman S. Abdelmegeed. 2021. “β-Lactam Resistance Associated with β-Lactamase Production and Porin Alteration in Clinical Isolates of E. Coli and K. Pneumoniae”. *PLoS ONE* 16(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0251594.

Khoshbin, Amir, Jeannette P. So, Ilyas S. Aleem, Derek Stephens, Anne G. Matlow, y James G. Wright. 2015. “Antibiotic Prophylaxis to Prevent Surgical Site Infections in Children: A Prospective Cohort Study”. *Annals of Surgery* 262(2):397–402. doi: 10.1097/SLA.0000000000000938.

Kieslichova, Eva, Marek Protus, Dana Nemcova, y Eva Uchytilova. 2019. “Single Mutidrug Resistant Enterobacteriacae Donor-Derived Infection in Four Solid Organ Transplant Recipients: A Case Report”. *BMC Surgery* 19(1). doi: 10.1186/S12893-019-0574-9.

Kim, Hyun, Ju Hye Jang, Sun Chang Kim, y Ju Hyun Cho. 2014. “De Novo Generation of Short Antimicrobial Peptides with Enhanced Stability and Cell Specificity”. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(1):121–32. doi: 10.1093/JAC/DKT322.

Kim, Si Won, Jung Seok Lee, Seong bin Park, Ae Rin Lee, Jae Wook Jung, Jin Hong Chun, Jassy Mary S. Lazarte, Jaesung Kim, Jong Su Seo, Jong Hwan Kim, Jong Wook Song, Min Woo Ha, Kim D. Thompson, Chang Ro Lee, Myunghwan Jung, y Tae Sung Jung. 2020. “The Importance of Porins and β-Lactamase in Outer Membrane Vesicles on the Hydrolysis of β-Lactam Antibiotics”. *International Journal of Molecular Sciences* 21(8):2822. doi: 10.3390/IJMS21082822.

Koelsch, Gerald, Jordan Tang, Jeffrey A. Loy, Michel Monod, Kenneth Jackson, Stephen I. Foundling, y Xinli Lin. 2000. “Enzymic Characteristics of Secreted Aspartic Proteases of Candida Albicans”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1480(1–2):117–31. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00068-6.

Kowalska-Krochmal, Beata, y Ruth Dudek-Wicher. 2021. “The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance”. *Pathogens* 10(2):1–21. doi: 10.3390/PATHOGENS10020165.

Kuroda, Kenichi, Gregory A. Caputo, y William F. DeGrado. 2009. “The Role of Hydrophobicity in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Polymethacrylate Derivatives”. *Chemistry* 15(5):1123–33. doi: 10.1002/CHEM.200801523.

Kussmann, Jörg, Matthias Beer, y Christian Ochsenfeld. 2013. “Linear-Scaling Self-Consistent Field Methods for Large Molecules”. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 3(6):614–36. doi: 10.1002/WCMS.1138.

Lehrer, Robert I., y Tomas Ganz. 1999. “Antimicrobial Peptides in Mammalian and Insect Host Defence”. *Current Opinion in Immunology* 11(1):23–27. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80005-3.

Lei, Jun, Li Chun Sun, Siyu Huang, Chenhong Zhu, Ping Li, Jun He, Vienna Mackey, David H. Coy, y Quan Yong He. 2019. “The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications”. *American Journal of Translational Research* 11(7):3919.

Lill, Markus A., y Matthew L. Danielson. 2011. “Computer-Aided Drug Design Platform Using PyMOL”. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 25(1):13–19. doi: 10.1007/S10822-010-9395-8.

Lim, Daniel, y Natalie C. J. Strynadka. 2002. “Structural Basis for the Beta Lactam Resistance of PBP2a from Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus”. *Nature Structural Biology* 9(11):870–76. doi: 10.1038/NSB858.

Lombard, Jonathan. 2014. “Once upon a Time the Cell Membranes: 175 Years of Cell Boundary Research”. *Biology Direct* 9(1):1–35. doi: 10.1186/S13062-014-0032-7/FIGURES/11.

Luong, Huy Xuan, Tung Truong Thanh, y Tuan Hiep Tran. 2020. “Antimicrobial Peptides – Advances in Development of Therapeutic Applications”. *Life Sciences* 260:118407. doi: 10.1016/J.LFS.2020.118407.

Ma, Yuming, Yihui Liu, y Jinyong Cheng. 2018. “Protein Secondary Structure Prediction Based on Data Partition and Semi-Random Subspace Method”. *Scientific Reports 2018 8:1* 8(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-018-28084-8.

Macheboeuf, Pauline, Carlos Contreras-Martel, Viviana Job, Otto Dideberg, y Andréa Dessen. 2006. “Penicillin Binding Proteins: Key Players in Bacterial Cell Cycle and Drug Resistance Processes”. *FEMS Microbiology Reviews* 30(5):673–91. doi: 10.1111/J.1574-6976.2006.00024.X.

Malanovic, Nermina, y Karl Lohner. 2016. “Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria”. *Pharmaceuticals* 9(3). doi: 10.3390/PH9030059.

Malmsten, Martin. 2014. “Antimicrobial Peptides”. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119(2):199. doi: 10.3109/03009734.2014.899278.

Marcelino, Anna Marie C., y Lila M. Gierasch. 2008. “Roles of β-Turns in Protein Folding: From Peptide Models to Protein Engineering”. *Biopolymers* 89(5):380. doi: 10.1002/BIP.20960.

McPherson, Derrell C., y David L. Popham. 2003. “Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in Bacillus Subtilis”. *Journal of Bacteriology* 185(4):1423–31. doi: 10.1128/JB.185.4.1423-1431.2003.

Meng, Xuan-Yu, Hong-Xing Zhang, Mihaly Mezei, y Meng Cui. 2011. “Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery”. *Current Computer-Aided Drug Design* 7(2):146. doi: 10.2174/157340911795677602.

Mouyna, Isabelle, Lukas Hartl, y Jean Paul Latgé. 2013. "β-1,3-Glucan Modifying Enzymes in Aspergillus Fumigatus". *Frontiers in Microbiology* 4(APR). doi: 10.3389/FMICB.2013.00081.

Mwangi, James, Yizhu Yin, Gan Wang, Min Yang, Ya Li, Zhiye Zhang, y Ren Lai. 2019. "The Antimicrobial Peptide ZY4 Combats Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa and Acinetobacter Baumannii Infection". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(52):26516–22. doi: 10.1073/PNAS.1909585117.

Naglik, Julian R., Stephen J. Challacombe, y Bernhard Hube. 2003. "Candida Albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3):400. doi: 10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003.

OMS. 2021a. "Caesarean Section Rates Continue to Rise, amid Growing Inequalities in Access". Recuperado el 27 de enero de 2023 (https://www.who.int/news/item/16-06-2021-caesarean-section-rates-continue-to-rise-amid-growing-inequalities-in-access).

OMS. 2021b. "Diabetes". Recuperado el 27 de enero de 2023 (https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1).

Papagianni, Maria. 2003. "Ribosomally Synthesized Peptides with Antimicrobial Properties: Biosynthesis, Structure, Function, and Applications". *Biotechnology Advances* 21(6):465–99. doi: 10.1016/S0734-9750(03)00077-6.

Patocka, Jiri, Eugenie Nepovimova, Blanka Klimova, Qinghua Wu, y Kamil Kuca. 2019. "Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides". *Current Medicinal Chemistry* 26(32):5924–46. doi: 10.2174/0929867325666180713125314.

PepCalc. 2020. "Peptide Calculator". Recuperado el 1 de febrero de 2023 (https://www.pep-calc.com/).

Pirtskhalava, Malak, Boris Vishnepolsky, Maya Grigolava, y Grigol Managadze. 2021. "Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane". *Pharmaceuticals* 14(5). doi: 10.3390/PH14050471.

Prabi. 2020. "GOR4 Secondary Structure Prediction". Recuperado el 1 de febrero de 2023 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html).

PredictProtein. 2020. "PredictProtein - Protein Sequence Analysis, Prediction of Structural and Functional Features". Recuperado el 29 de enero de 2023 (https://predictprotein.org/).

Prestinaci, Francesca, Patrizio Pezzotti, y Annalisa Pantosti. 2015. "Antimicrobial Resistance: A Global Multifaceted Phenomenon". *Pathogens and Global Health* 109(7):309. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

Proaño-Bolaños, Carolina, Ailín Blasco-Zúñiga, José Rafael Almeida, Lei Wang, Miguel Angel Llumiquinga, Miryan Rivera, Mei Zhou, Tianbao Chen, y Chris Shaw. 2019. "Unravelling the Skin Secretion Peptides of the Gliding Leaf Frog, Agalychnis Spurrelli (Hylidae)". *Biomolecules* 9(11). doi: 10.3390/BIOM9110667.

Reddy, K. V. R., R. D. Yedery, y C. Aranha. 2004. "Antimicrobial Peptides: Premises and Promises". *International Journal of Antimicrobial Agents* 24(6):536–47. doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2004.09.005.

Rost, Burkhard, y Jinfeng Liu. 2003. “The PredictProtein Server”. *Nucleic Acids Research* 31(13):3300. doi: 10.1093/NAR/GKG508.

Ruden, Serge, Annika Rieder, Irina Chis Ster, Thomas Schwartz, Ralf Mikut, y Kai Hilpert. 2019. “Synergy Pattern of Short Cationic Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa”. *Frontiers in Microbiology* 10. doi: 10.3389/FMICB.2019.02740.

Salo-Ahen, Outi M. H., Ida Alanko, Rajendra Bhadane, Alexandre M. Alexandre, Rodrigo Vargas Honorato, Shakhawath Hossain, André H. Juffer, Aleksei Kabedev, Maija Lahtela-Kakkonen, Anders Støttrup Larsen, Eveline Lescrinier, Parthiban Marimuthu, Muhammad Usman Mirza, Ghulam Mustafa, Ariane Nunes-Alves, Tatu Pantsar, Atefeh Saadabadi, Kalaimathy Singaravelu, y Michiel Vanmeert. 2020. “Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development”. *Processes 2021, Vol. 9, Page 71* 9(1):71. doi: 10.3390/PR9010071.

Sasidharan, Santanu, y Prakash Saudagar. 2022. “Chapter 23 - Prediction, Validation, and Analysis of Protein Structures: A Beginner’s Guide”. Pp. 373–85 en *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*. Academic Press.

Schmidt, Nathan W., y Gerard C. L. Wong. 2013. “Antimicrobial Peptides and Induced Membrane Curvature: Geometry, Coordination Chemistry, and Molecular Engineering”. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 17(4):151. doi: 10.1016/J.COSSMS.2013.09.004.

Schwechheimer, Carmen, y Meta J. Kuehn. 2015. “Outer-Membrane Vesicles from Gram-Negative Bacteria: Biogenesis and Functions”. *Nature Reviews. Microbiology* 13(10):605. doi: 10.1038/NRMICRO3525.

Sen, Taner Z., Robert L. Jernigan, Jean Garnier, y Andrzej Kloczkowski. 2005. “GOR V Server for Protein Secondary Structure Prediction”. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21(11):2787. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI408.

Shaw, Kevin L., Gerald R. Grimsley, Gennady I. Yakovlev, Alexander A. Makarov, y C. Nick Pace. 2001. “The Effect of Net Charge on the Solubility, Activity, and Stability of Ribonuclease Sa”. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 10(6):1206. doi: 10.1110/PS.440101.

Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, y Suzanne Walker. 2010. “The Bacterial Cell Envelope”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A000414.

Skipper, L. 2005. *Proteins | Overview*. Third Edition. Academic Press.

Su, Guobin, Hong Xu, Emilia Riggi, Zhiren He, Liming Lu, Bengt Lindholm, Gaetano Marrone, Zehuai Wen, Xusheng Liu, David W. Johnson, Juan Jesus Carrero, y Cecilia Stålsby Lundborg. 2018. “Association of Kidney Function with Infections by Multidrug-Resistant Organisms: An Electronic Medical Record Analysis”. *Scientific Reports* 8(1). doi: 10.1038/S41598-018-31612-1.

Takechi-Haraya, Yuki, Takashi Ohgita, Mana Kotani, Hiroki Kono, Chihiro Saito, Hiroko Tamagaki-Asahina, Kazuchika Nishitsuji, Kenji Uchimura, Takeshi Sato, Ryuji Kawano, Kumiko Sakai-Kato, Ken ichi Izutsu, y Hiroyuki Saito. 2022. “Effect of Hydrophobic Moment on Membrane Interaction and Cell Penetration of Apolipoprotein E-Derived Arginine-Rich Amphipathic α-Helical Peptides”. *Scientific Reports 2022 12:1* 12(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-022-08876-9.

Talapko, Jasminka, Tomislav Meštrović, Martina Juzbašić, Matej Tomas, Suzana Erić, Lorena Horvat Aleksijević, Sanja Bekić, Dragan Schwarz, Suzana Matić, Marijana Neuberg, y Ivana Škrlec. 2022.

"Antimicrobial Peptides-Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications". *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11(10). doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11101417.

Tang, Zehui, Tonghua Li, Rida Liu, Wenwei Xiong, Jiangming Sun, Yaojuan Zhu, y Guanyan Chen. 2011. "Improving the Performance of β-Turn Prediction Using Predicted Shape Strings and a Two-Layer Support Vector Machine Model". *BMC Bioinformatics* 12(1):1–9. doi: 10.1186/1471-2105-12-283/FIGURES/7.

Trott, Oleg, y Arthur J. Olson. 2010. "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading". *Journal of Computational Chemistry* 31(2):NA-NA. doi: 10.1002/JCC.21334.

Vento, Sandro, y Francesca Cainelli. 2003. "Infections in Patients with Cancer Undergoing Chemotherapy: Aetiology, Prevention, and Treatment". *Lancet Oncology* 4(10):595–604. doi: 10.1016/S1470-2045(03)01218-X.

Vivas, Roberto, Ana Andréa Teixeira Barbosa, Silvio Santana Dolabela, y Sona Jain. 2019. "Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview". *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 25(6):890–908. doi: 10.1089/MDR.2018.0319.

Vlieghe, Patrick, Vincent Lisowski, Jean Martinez, y Michel Khrestchatisky. 2010. "Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market". *Drug Discovery Today* 15(1–2):40–56. doi: 10.1016/J.DRUDIS.2009.10.009.

Wang, Qi, Fenfen Zhu, Yinqiang Xin, Jia Liu, Lan Luo, y Zhimin Yin. 2011. "Expression and Purification of Antimicrobial Peptide Buforin IIb in Escherichia Coli". *Biotechnology Letters* 33(11):2121–26. doi: 10.1007/S10529-011-0687-4/METRICS.

Wang, Ying, Yue Zhang, Wen Hui Lee, Xinwang Yang, y Yun Zhang. 2016. "Novel Peptides from Skins of Amphibians Showed Broad-Spectrum Antimicrobial Activities". *Chemical Biology & Drug Design* 87(3):419–24. doi: 10.1111/CBDD.12672.

Wu, Jianrong, Ruoyu Yang, Minjie Gao, Hongtao Zhang, y Xiaobei Zhan. 2021. "Chapter 2 - Synthesis of Functional Oligosaccharides and Their Derivatives through Cocultivation and Cellular NTP Regeneration". Pp. 35–63 en *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 115. Academic Press.

Xiong, Menghua, Michelle W. Lee, Rachael A. Mansbach, Ziyuan Song, Yan Bao, Richard M. Peek, Catherine Yao, Lin Feng Chen, Andrew L. Ferguson, Gerard C. L. Wong, y Jianjun Cheng. 2015. "Helical Antimicrobial Polypeptides with Radial Amphiphilicity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(43):13155–60. doi: 10.1073/PNAS.1507893112/SUPPL_FILE/PNAS.1507893112.SM03.MP4.

Xu, Xueqing, y Ren Lai. 2015. "The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions". *Chemical Reviews* 115(4):1760–1846. doi: 10.1021/CR4006704.

Yang, Wei, Zhentao Hu, Lin Zhou, y Yong Jin. 2022. "Protein Secondary Structure Prediction Using a Lightweight Convolutional Network and Label Distribution Aware Margin Loss". *Knowledge-Based Systems* 237:107771. doi: 10.1016/J.KNOSYS.2021.107771.

Yin, Lois M., Michelle A. Edwards, Jessica Li, Christopher M. Yip, y Charles M. Deber. 2012. "Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions". *The Journal of Biological Chemistry* 287(10):7738. doi: 10.1074/JBC.M111.303602.

Yu, Wenbo, y Alexander D. Mackerell. 2017. “Computer-Aided Drug Design Methods”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1520:85. doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_5.

Zhang, Baohua, Hui Li, Kunqian Yu, y Zhong Jin. 2022. “Molecular Docking-Based Computational Platform for High-Throughput Virtual Screening”. *Ccf Transactions on High Performance Computing* 4(1):63. doi: 10.1007/S42514-021-00086-5.

Zhang, Minghui, Jianhong Ouyang, Lei Fu, Cheng Xu, Yuke Ge, Shuqing Sun, Xiangyuan Li, Shian Lai, Hengte Ke, Bing Yuan, Kai Yang, Haining Yu, Lianghui Gao, y Yipeng Wang. 2022. “Hydrophobicity Determines the Bacterial Killing Rate of α-Helical Antimicrobial Peptides and Influences the Bacterial Resistance Development”. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C01238/SUPPL_FILE/JM2C01238_SI_002.CSV.

Zhang, Qi Yu, Zhi bin Yan, Yue Ming Meng, Xiang Yu Hong, Gang Shao, Jun Jie Ma, Xu Rui Cheng, Jun Liu, Jian Kang, y Cai Yun Fu. 2021. “Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action, Activity and Clinical Potential”. *Military Medical Research* 8(1). doi: 10.1186/S40779-021-00343-2.

Zhang, Yang. 2008. “I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction”. *BMC Bioinformatics* 9(1):1–8. doi: 10.1186/1471-2105-9-40/FIGURES/4.

Zhong Lab. 2020. “I-TASSER Server for Protein Structure and Function Prediction”. Recuperado el 1 de febrero de 2023 (https://zhanggroup.org/I-TASSER/).

FIGURAS

Figura 1. Diagrama de rueda helicoidal del péptido Picturina – 2 generado con HeliQuest.

Los residuos cargados positivamente se representan en azul; los residuos hidrofóbicos están en amarillo y su cara hidrofóbica se encuentra debajo de la rueda; los residuos neutros están en gris, y la Asp y Gln, están en rosa; mientras que la Pro se encuentra en verde. La flecha representa el momento hidrofóbico helicoidal; extraído de (HeliQuest 2022).

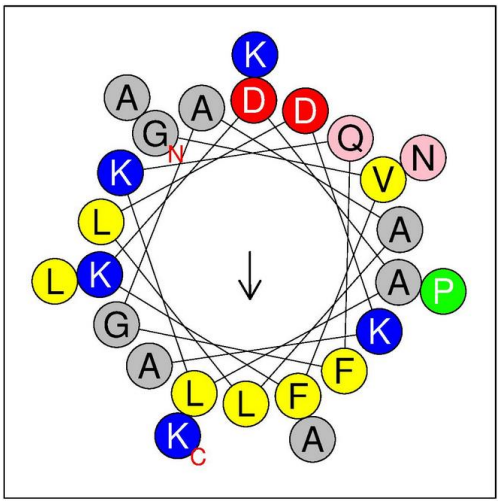


Figura 2. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de Jpred.

Jnet es la estructura secundaria final; donde los guiones representan los “random coils”; las H de color rojo representan las α-hélices. Jhmm arroja una predicción basada en el perfil de modelo oculto de Markov (HMM); representando lo mismo que Jnet. Lupas arroja la predicción de “Coiled-coil”; tamaño de ventana de 14, 21 y 28; donde el guion representa una probabilidad de >50 %; la c representa una probabilidad % 50≤x≤90 %, la C representa una probabilidad de >90 %. Jnet_25, Jnet_5 y Jnet_0 arroja una predicción de acceso del solvente a dichas regiones (Burial regions); donde la B representa las regiones hidrofóbicas donde el solvente (en este caso agua) con una probabilidad del 25 %, 5 % y 0 % va a poder acceder. Por último, Jnet Rel arroja la confiabilidad del algoritmo, donde varía, de 0 a 9, siendo el número que más se acerque al 9, dicho estado conformacional es viable; extraído de (Drozdetskiy et al. 2015).

```
jp_Pnd1GsA : GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK : jp_Pnd1GsA

           : 1---------11--------21--- :
OrigSeq    : GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK : OrigSeq

Jnet       : --HHHHHHHHHHHHHHHHHH---- : Jnet
jhmm       : --HHHHHHHHHHHHHHHHHH---- : jhmm

Lupas 14   : ------------------------- : Lupas 14
Lupas 21   : ------------------------- : Lupas 21
Lupas 28   : ------------------------- : Lupas 28

Jnet_25    : -----BB--BBB-BB--BB------ : Jnet_25
Jnet_5     : ----------B--BB---------- : Jnet_5
Jnet_0     : ------------------------- : Jnet_0
Jnet Rel   : 994899999999999999746999 : Jnet Rel
```

Figura 3. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de PredictProtein.

RePROF es la estructura secundaria final; donde las líneas horizontales de color azul representan las α-hélices; las líneas de color amarillo representan “otros”. RePROF de accesibilidad del solvente; siendo el color azul una zona expuesta frente al solvente; el color amarillo una zona inasequible frente al solvente. Regiones intrínsecamente desordenadas del metatrastorno representa el nivel de confianza; representando el nivel de confianza bajo, de color azul, y el nivel de confianza medio, de color púrpura. PROFbval identifican los sitos activos como rígidos; los residuos coloreados en azul marcan los valores B más bajos (más rígidos); de color púrpura marcan los valores B intermedios; de color amarillo marcan los valores B más altos; extraído de (PredictProtein 2020).

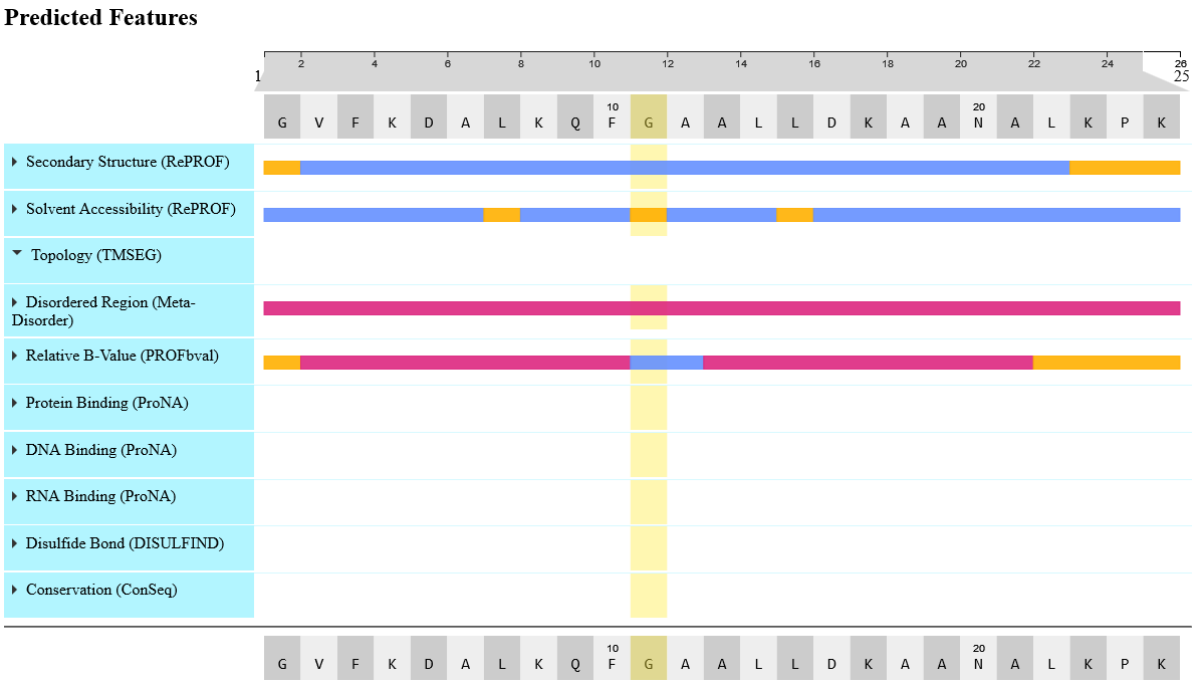
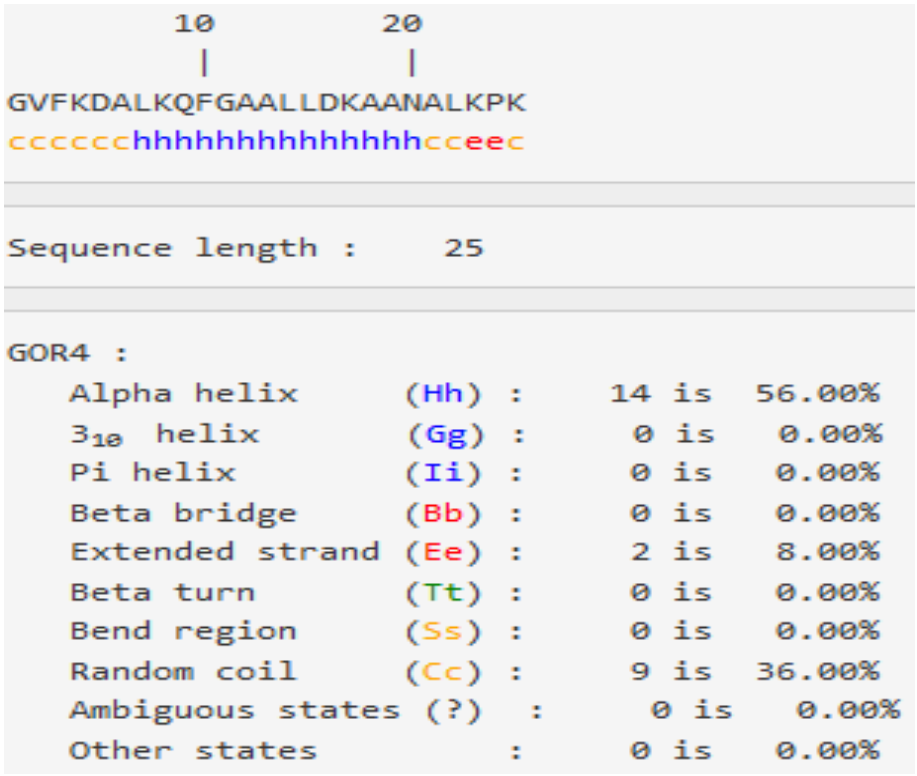


Figura 4. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de GOR4.

Las letras c minúsculas de color amarillo representan “random-coil”; mientras las letras h minúsculas de color azul representan α-hélices; por último, las letras “e” minúsculas de color rojo representan “extended-strand “. Extraído de (Prabi 2020)



```
         10         20
          |          |
GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK
ccccccHHHHHHHHHHHHHHcceec

Sequence length :    25

GOR4 :
   Alpha helix      (Hh) :    14 is  56.00%
   3₁₀ helix        (Gg) :     0 is   0.00%
   Pi helix         (Ii) :     0 is   0.00%
   Beta bridge      (Bb) :     0 is   0.00%
   Extended strand  (Ee) :     2 is   8.00%
   Beta turn        (Tt) :     0 is   0.00%
   Bend region      (Ss) :     0 is   0.00%
   Random coil      (Cc) :     9 is  36.00%
   Ambiguous states (?)  :     0 is   0.00%
   Other states          :     0 is   0.00%
```

Figura 5. Predicción de la estructura secundaria final de la Picturina – 2 obtenida de I-TASSER.

La conformación α-helix está representado con las letras de “h” de color rojo, mientras la conformación “random coils” por la letra c mayúscula de color negro. El término de “conf. Score”, arroja la confiabilidad del algoritmo, donde varía, de 0 a 9, siendo el número que más se acerque al 9, dicho estado conformacional es viable. De igual manera, arroja una predicción acceso del solvente (en este caso, agua principalmente) a los diferentes aminoácidos de la secuencia; donde varía, de 0 a 9, siendo el número que más se acerque al 9, está más expuesto al solvente. Extraído de (Zhong Lab 2020)

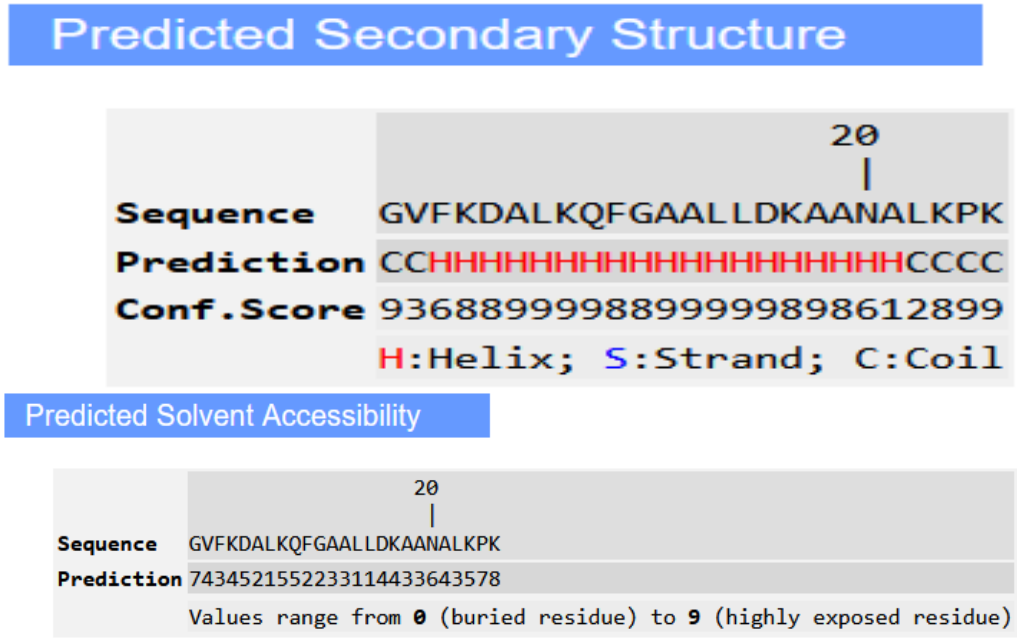


Figura 6. Proyección molecular de la Picturina – 2 obtenida mediante el programa PyMOL.

La conformación α-hélice está representada con el color rojizo (3-21/, ss=”H”); mientras las “*random coils*” de color verduzco (1-2/, ss=” L” y 22-25/, ss=” L”). El terminal N está a la izquierda y el terminal C está a la derecha. La figura está representada en formato “*cartoon*”.



Figura 7. Visualización molecular de la estructura optimizada y energéticamente estable de la Picturina – 2 obtenido en Gaussian09.



Figura 8. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) "Penicillin-binding protein 2a"– 2PIC y b) AmiA – 2PIC.

La interacción de mayor afinidad entre el péptido antimicrobiano 2PIC y las enzimas seleccionadas para el microorganismo S. aureus está representada visualmente con la imagen **b)**.

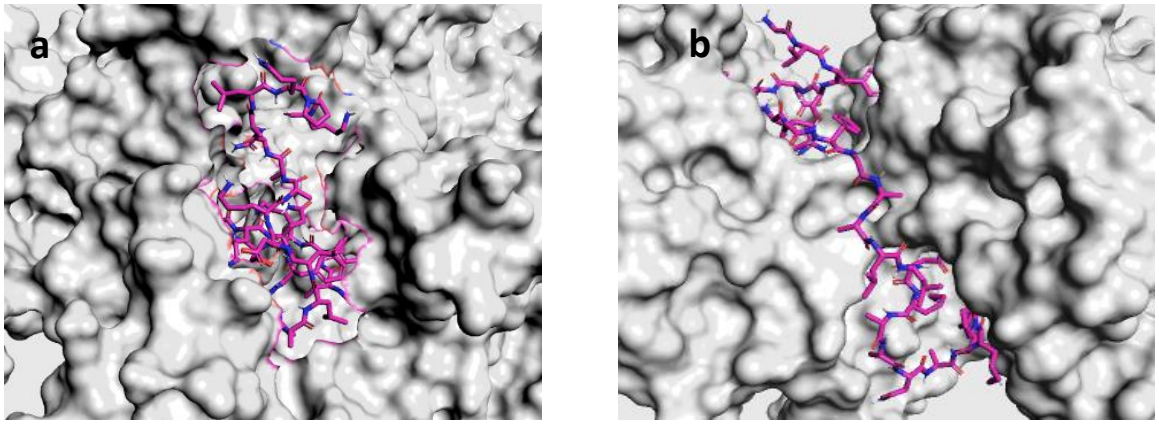


Figura 9. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) GyrB– 2PIC y b) "Penicillin-binding Protein 1b" – 2PIC.

La interacción de mayor afinidad entre el péptido antimicrobiano 2PIC y las enzimas seleccionadas para el microorganismo E. coli está representada visualmente con la imagen **a)**.

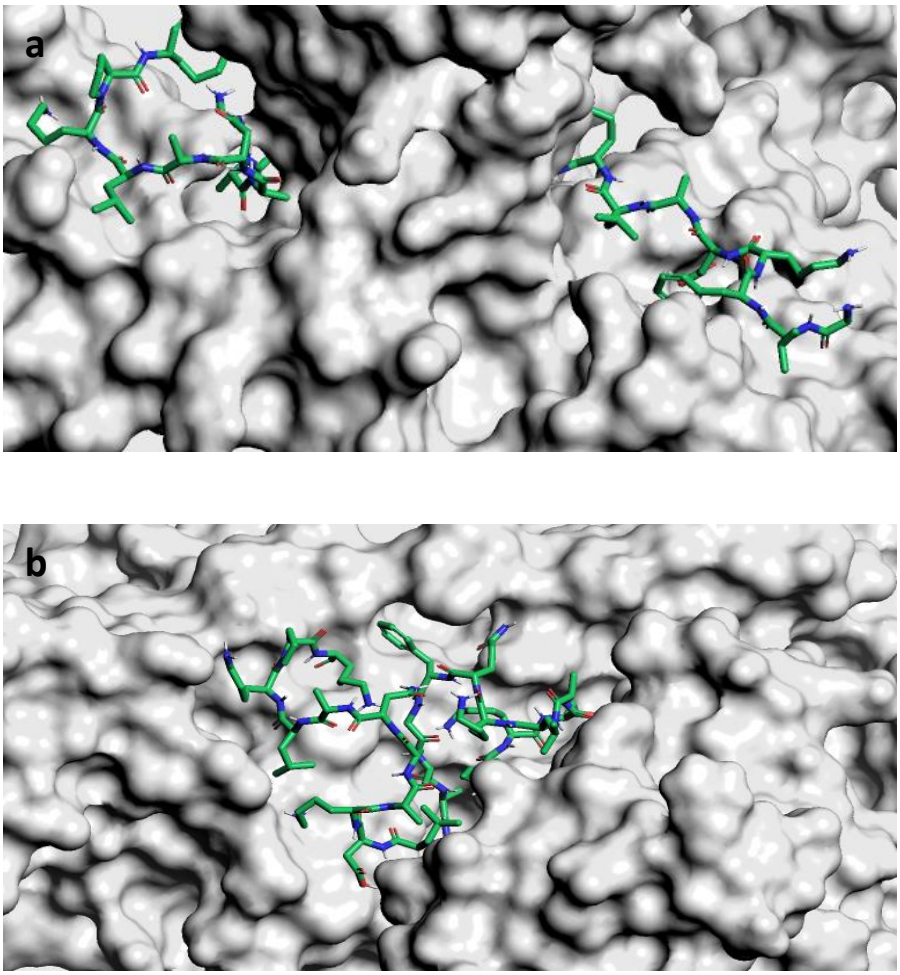


Figura 10. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) OmpC– 2PIC, b) OmpF– 2PIC y c) AmpD–2PIC.

La interacción de mayor afinidad entre el péptido antimicrobiano 2PIC y las enzimas seleccionadas para el microorganismo C. freundii está representada visualmente con la imagen b).

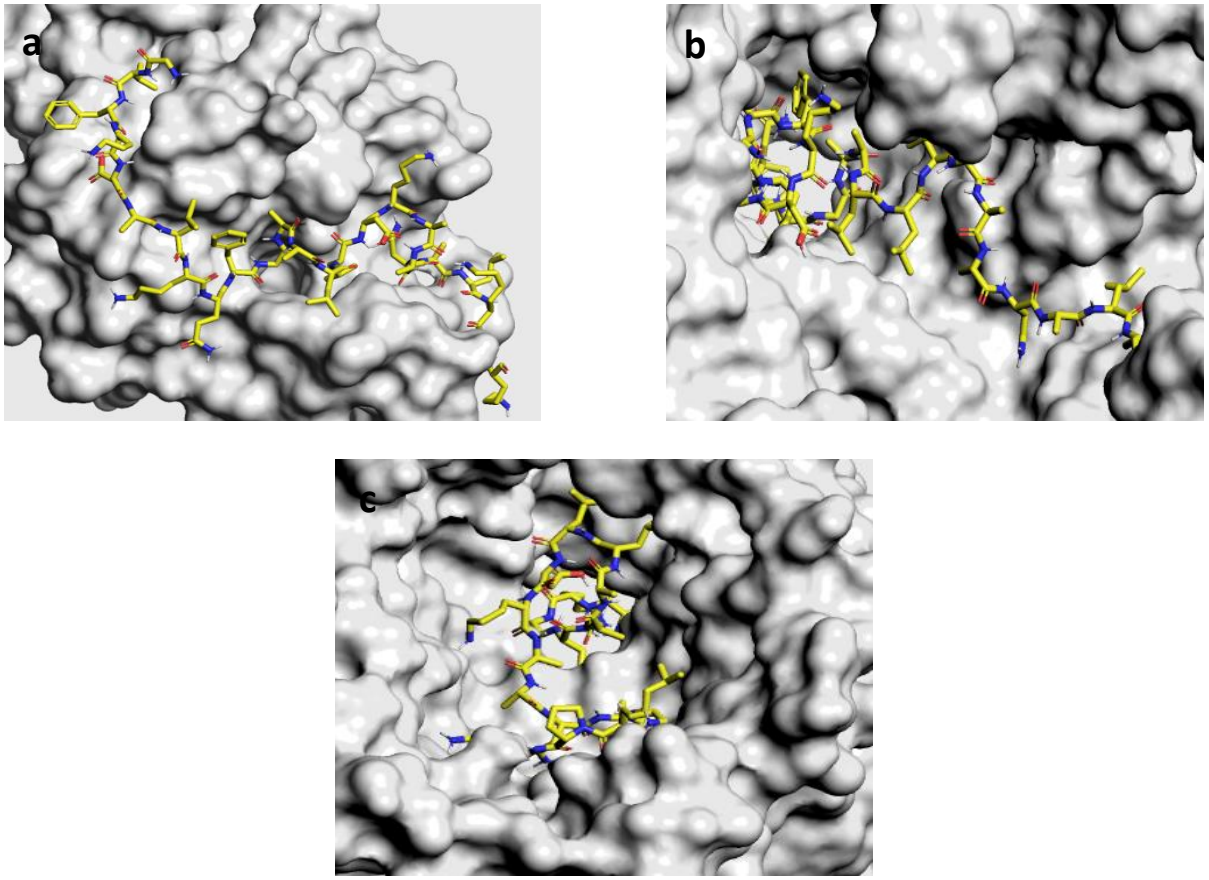
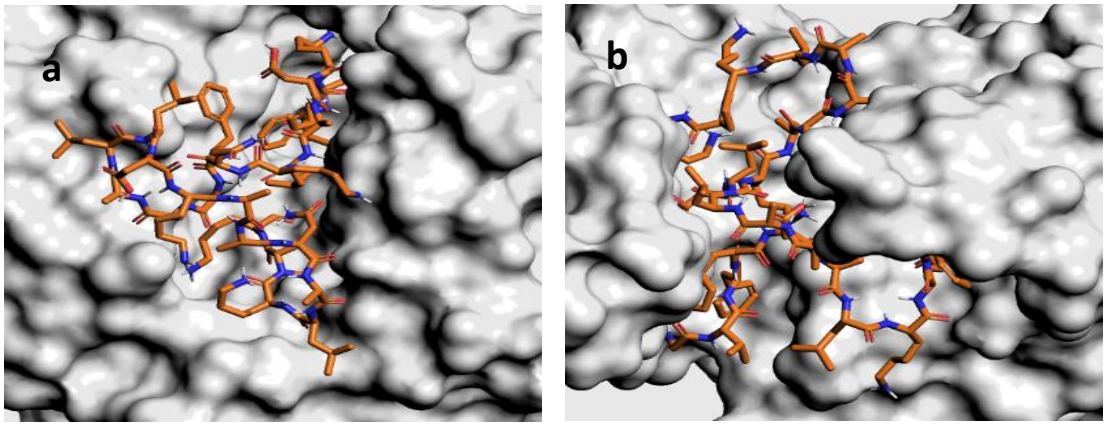


Figura 11. Complejos de proteína-ligando formados entre. a) Exo-β-(1,3)-glucanasa – 2PIC y b) Proteasa aspártica secretada – 2PIC.

La interacción de mayor afinidad entre el péptido antimicrobiano 2PIC y las enzimas seleccionadas para el microorganismo C. albicans está representada visualmente con la imagen b).



TABLAS

Tabla 1. Valores de Propiedades Fisicoquímicas del Péptido Picturina - 2 Extraídas del Servidor PepCalc y Bachem

Propiedades	Servidor PepCalc Valor	Servidor Bachem Valor
Numero de Residuos	25	25
Peso molecular	2615,08 (g/mol)	2615,11 (g/mol)
Coeficiente de Extinción	0 M^{-1} cm^{-1}	0 M^{-1} cm^{-1}
Punto Isoeléctrico	pH 10,53	pH 10,41
Carga neta a pH neutro	+3,00	+3,00
Solubilidad Estimada	Buena solubilidad en agua	–
Hidrofilicidad promedio	–	0,19

Nota. La atribución de derechos de autor frente a dichos valores es el servidor PepCal y Bachem (PepCalc 2020; BACHEM 2020).

Tabla 2. Secuencias, Peso Molecular, Carga Neta y Porcentaje Hidrofóbico de Aminoácidos de los Péptidos Estándares y el de Interés

Péptido	Secuencia	Peso molecular	Residuos hidrofóbicos (%)	Hª	Carga neta
Magainin – 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	2466	43	-0,58	+3
Buforina – 2	RAGLQFPVGRLLRRLLRRLLR	2560	47	0,0	+7

Picturina – 2	GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK	2615	56	0,19	+3

Nota. Atribución de derechos de autor frente a dichos valores (Kim et al. 2014).

[a] La hidrofobicidad media (H) es la hidrofobicidad total (suma de todos los índices de hidrofobicidad de los residuos) dividida por el número de residuos.

Tabla 3. Actividades Antimicrobianas de los Péptidos Estándares y el de interés en Condiciones Estándar de Ensayo de Actividad Antimicrobiana

Microorganismos	MIC (mg/L)[a]		
	Magainin – 2	Buforina – 2b	Picturina – 2
Bacterias Grampositivas			
S. aureus	8	2	>512
Bacterias Gramnegativas			
E. coli	32	4	128
C. freundii	–	–	128
Hongos			
C. albicans	4	2	>512

Nota. Atribución de derechos de autor frente a dichos valores (Kim et al. 2014).

[a] MIC significa la concentración inhibitoria mínima, siendo la concentración más baja (en µg/mL) de un antibiótico en la que inhibe el crecimiento de una determinada cepa de bacterias (Kowalska-Krochmal y Dudek-Wicher 2021).

Tabla 4. Valores de Afinidad entre la Picturina - 2 y Diferentes Enzimas

Microorganismo	Enzima	Afinidad (kcal/mol) – Picturina – 2
S. aureus	"Penicillin-binding protein 2a"	-6,3
	AmiA	-7,3
E. coli	GyrB	-7,8
	"Penicillin-binding Protein 1b"	-5,4
C. freundii	OmpC	-7,9
	OmpF	-8,0
	AmpD	-6,0
C. albicans	Exo-β-(1,3)-glucanasa	-5,9
	Proteasa aspártica secretada	-6,4

Nota. Los diferentes valores de afinidad fueron generados a partir del programa AutoDock Vina (Trott y Olson 2010).