



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE LA FLEXIBILIDAD CONFORMACIONAL EN CINCO PEPTIDOS
ANTIMICROBIANOS DE LOS VENENOS DE ALACRANES *Urodacus yaschenkoi*
Y *Androctonus crassicauda***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

RAMOS RAMIREZ CARLOS DAVID

DIRECTORA DE TESIS:

D. C. Verónica Liliana Ramírez Falcon

ASESOR EXTERNO:

D. C. Daniel Balleza Mejía

PUEBLA, PUE. 10 de septiembre de 2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su amor y apoyo incondicional durante todo mi proceso estudiantil, su paciencia y comprensión fueron fundamentales para mí, sin ellos nada sería posible para mí.

A mi madre por ser la primera persona en creer en mí, por educarme y siempre estar ahí para orientarme y ser la mejor consejera.

A mi padre, por ser el sostén de la familia, porque por más difícil que fuera la situación él nunca me dijo que no a nada que me hiciera falta.

A mis hermanos y sobrinos por alentarme a ser mejor, por ser cada uno un ejemplo para mí.

A la Dra. Verónica Liliana Ramírez Falcon, al Dr. Daniel Balleza Mejía y a la Dra. Verónica Quintero Hernández por darme la oportunidad de realizar este trabajo, porque dedicaron mucho de su valioso tiempo y conocimiento para poder hacer esto posible.

A mi esposa Sandra Paola López López, porque siempre está a mi lado apoyándome en todo sin importar la situación, dándome su amor incondicional.

A mi hija Hannia, mi pequeña princesa que es mi motor y mis ganas de seguir adelante, porque el tiempo que use durante la elaboración de este proyecto no lo podré recuperar, pero que espero en algunos años lo veas y estes orgullosa de mí como yo lo estoy de ti.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE GRAFICAS	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCION	9
1.1 Propiedades antimicrobianas de los compuestos naturales	9
1.2 Tratamiento con antibióticos	9
1.3 Resistencia antimicrobiana	9
2.ANTECEDENTES.....	10
2.1 Líneas de defensa de la resistencia antimicrobiana	10
2.2 Péptidos.....	11
2.3 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	12
2.4 Veneno de alacranes	13
2.5 Uso de los venenos en la industria farmacéutica.....	14
2.6 Propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos aislados en venenos de alacrán.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	20
6. MATERIALES	21
6.1 Herramientas bioinformáticas:	21
6.2 Material biológico:	21
6.3 Equipos	21
7. MÉTODOS	22
7.1.1 Predicción de las estructuras de los cinco péptidos cortos seleccionados.	22
7.1.2 Alineamiento de los péptidos seleccionados	22
7.1.3 Creación de un logo de secuencia	22

7.1.4 Visualización de los modelos generados	22
7.1.5 Cálculo de hidrofobicidad, momento hidrofóbico y carga neta	22
7.1.6 Cálculo de la flexibilidad intrínseca	22
7.1.7 Simulaciones de Dinámica Molecular	22
7.1.8 Cálculo del momento dipolar	22
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8.1 Alineamiento de secuencias	23
8.2 Logo generado.....	23
8.3 Propiedades fisicoquímicas de cada péptido	24
8.4 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)	24
8.5 Modelos estructurales generados	25
8.6 Simulaciones de cada péptido	27
8.7 Coeficiente de bioactividad.....	29
8.8 Análisis de combinatoria	31
8.9 Visualización de las parejas de péptidos.....	33
8.10 Diagramas de Ramachandran	34
8.11 Propuesta de sistema de interacción péptido/lípido	35
9. CONCLUSIONES	37
10. REFERENCIAS.....	38
11. ANEXOS	45
11.1 Búsqueda de las secuencias para cada péptido.....	45
11.2 Generación de modelos estructurales	45
11.3 Alineamiento de secuencias.....	48
11.4 Generación de logos de secuencias primarias	50
11.5 Validación de los modelos.....	52
11.6 Cálculo de parámetros fisicoquímicos.....	54
11.7 Cálculo de la flexibilidad intrínseca.....	56
11.8 Cálculo del momento dipolar.....	57
11.9 Cálculo del Índice de Boman.....	58

11.10 Simulaciones de dinámica molecular	60
11.11 Índice GRAVY (Grand Average of Hydrophobicity).....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de los PAM	18
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas calculadas.	24
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de 5 péptidos antimicrobianos sobre cepas de bacterias MDR.	25
Tabla 4. Cálculo del porcentaje conservación de orden	28
Tabla 5. Coeficiente de bioactividad calculado para cada PAM tomando en cuenta el potencial electrostático y el momento hidrofóbico (μH).	30
Tabla 6. Cálculo del potencial de bioactividad tomando en cuenta la hidrofobicidad ($\langle H \rangle$).	30
Tabla 7. Promedios y desviación estándar del RMSD para cada pareja en las simulaciones de cada péptido.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de las tres líneas de defensa que generan RAM,	10
Figura 2. Homología estructural entre el a) Acido para-aminobenzoico y b) la Sulfadoxina	11
Figura 3. Aminoácidos naturales agrupados por las propiedades químicas de su grupo lateral (R).	12
Figura 4. Efecto disruptor de la melitina.....	13
Figura 5. Componentes del veneno de alacrán y sus aplicaciones	14
Figura 6. Estructura química del Captopril.....	15
Figura 7. Estructura química de la Exenatida	15
Figura 8. Imagen del alacrán <i>Opisthacanthus madagascariensis</i> femenino	16
Figura 9. Modelos esquemáticos de los principales mecanismos de acción propuestos para los PAM	17
Figura 10. Imagen del alacrán <i>Urodacus yaschenkoi</i>	17

Figura 11. Imagen del alacrán <i>Androctonus crassicauda</i>	17
Figura 12. Diagrama de trabajo dividido en secciones.	20
Figura 13. Alineamiento de secuencias.....	23
Figura 14. Logo generado para las secuencias alineadas de los PAM	23
Figura 15. Modelos estructurares de los péptidos antimicrobianos	26
Figura 16. Péptidos antimicrobianos A) Uy17, B) Uy192, C) Uy234, D) AcrAP1, E) AcrAP2, y sus respectivas simulaciones	27
Figura 17. Modelos estructurales de las parejas de péptidos después de las simulaciones .	33
Figura 18. Diagramas de Ramachandran	34
Figura 19. Predicción del PAM AcrAP1.	35
Figura 20. Mecanismo de interacción péptido-membrana propuesto.	36
Figura 21. Servidor web “AlphaFold”	45
Figura 22. Interfaz inicial para la generación de estructuras	46
Figura 23. Interfaz para la carga de archivos al servidor “AlphaFold”.	46
Figura 24. Ajustes para la resolución de la estructura generada.	47
Figura 25. Interfaz de proceso para la generación de estructuras.....	47
Figura 26. Apartado de Plots para ejecutar la generación de estructuras.....	47
Figura 27. Ventana para realizar el alineamiento de secuencias	48
Figura 28. Ventana para la generación de un nuevo alineamiento	48
Figura 29. Ingreso de los datos de cada secuencia de los PAM.	49
Figura 30. Selección de la opción para realizar el alineamiento múltiple de secuencias	49
Figura 31. Ejecución del programa para el alineamiento múltiple de secuencias.	49
Figura 32. Identificación de similitudes para las secuencias alineadas	50
Figura 33. servidor web usado para la generación del logo	50
Figura 34. Interfaz del servidor “WebLogo”	51
Figura 35. Opciones avanzadas para la generación del logo.....	51
Figura 36. Ejemplo de logo generado para secuencias previamente alineadas de PAM del grupo de las pantininas	51
Figura 37. Servidor web “MolProbit”	52
Figura 38. Página de inicio del servidor “MolProbit”	52

Figura 39. Proceso de validación para cada estructura de los PAM.	52
Figura 40. Herramientas del servidor “MolProbity”	53
Figura 41. Generación de los diagramas de Ramachandran de las estructuras	53
Figura 42. Análisis estadístico de la geométrica de la estructura de cada PAM.....	54
Figura 43. Ejemplo de diagrama de Ramachandran	54
Figura 44. Servidor web “HeliQuest”.....	55
Figura 45. Interfaz de inicio del servidor Heliquest para el análisis y cribado de datos para secuencias alfa-helicoidales.....	55
Figura 46. Ventana de ingreso de secuencia del PAM y opciones para el cálculo de propiedades fisicoquímicas	55
Figura 47. Resumen de algunas propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, momento hidrofóbico y carga neta) calculadas para los PAM y diagrama de rueda helicoidal	56
Figura 48. Herramienta FlexiProt.	56
Figura 49. Ingreso de la secuencia del PAM para el cálculo de la flexibilidad intrínseca...	57
Figura 50. Cálculo del promedio del promedio para el parámetro “nB-factor2.....	57
Figura 51. Servidor web “Protein Dipole Moment”	57
Figura 52. Interfaz de inicio del servidor “Protein Dipole Moment”.....	58
Figura 53. Cálculo del momento dipolar y otras propiedades del PAM.....	58
Figura 54. Servidor web “Antimicrobial Peptide Database”.....	59
Figura 55. Inicio y herramientas del servidor “Antimicrobial Peptide Database”.....	59
Figura 56. Ingreso de la secuencia de cada PAM para el cálculo del índice de Boman	59
Figura 57. Página de redirección para visualizar los resultados de los parámetros calculados	59
Figura 58. Servidor web de WebGro	60
Figura 59. Ventana de carga para los archivos	60
Figura 60. Ingreso de datos de registro de usuario y especificaciones de las dinámicas moleculares	60
Figura 61. Parámetros solicitados para la ejecución de la dinámica molecular de cada estructura	61
Figura 62. Opciones de análisis de resultados de cada simulación	61
Figura 63. Servidor web “ProtParam” para el cálculo del índice GRAVY	61

Figura 64. Ingreso de la secuencia del PAM en el servidor ProtParam para el cálculo del índice GRAVY	62
Figura 65. Índice GRAVY calculado para el PAM Uy 234.....	62

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfico 1. Momento dipolar de cada simulación realizada en periodos de 100 ns.....	29
Gráfico 2. CMI vs Coeficiente de bioactividad calculado a partir del momento dipolar de cada PAM.	30
Gráfico 3. CMI vs Coeficiente de bioactividad calculado a partir de la hidrofobicidad de cada PAM.	31
Gráfico 4. Valores promedio de los RMSD de las parejas de combinaciones de las simulaciones para cada péptido.	32

RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son pequeñas biomoléculas naturales que muestran actividad antimicrobiana y desempeñan un papel crucial en la defensa innata de muchos organismos. Estos tienen propiedades fisicoquímicas y estructurales características, que son determinantes para su actividad biológica y su potencial terapéutico. El estudio de la dinámica conformacional de estos péptidos es fundamental para comprender sus posibles mecanismos de acción y su interacción con las membranas celulares de bacterias con interés clínico.

La dinámica conformacional se refiere a cómo la estructura tridimensional de una biomolécula cambia con respecto al tiempo en periodos extremadamente cortos (periodos en nanosegundos) y ante diferentes condiciones. Esto incluye la evaluación de cómo los PAM adoptan distintas conformaciones en respuesta a factores como el pH, o la temperatura. Estas conformaciones pueden influir en su capacidad para insertarse en las membranas bacterianas, lo que es esencial para entender su actividad biológica.

El método utilizado para estudiar estas dinámicas se realizó a través de simulaciones por computadora y mediante el uso de softwares. Las simulaciones permiten modelar interacciones a nivel atómico y así se puede evaluar cómo los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden afectar la función de los PAM al compararse sus bioactividades con los resultados de estas simulaciones.

El entendimiento de la dinámica conformacional de los PAM no solo proporciona información sobre su funcionalidad, sino que también puede ayudar en el diseño o mejora de nuevos agentes antimicrobianos para potenciar su efecto terapéutico, contribuyendo así a la lucha contra la resistencia antimicrobiana (RAM).

1. INTRODUCCION

1.1 Propiedades antimicrobianas de los compuestos naturales

Diversos compuestos encontrados en la naturaleza presentan propiedades antimicrobianas ante toda una gama de microorganismos, entre los cuales destacan las bacterias, hongos y algunos virus (Quintero *et al.*, 2017). Dado su efecto antimicrobiano, a esta clase de compuestos bioactivos se les puede considerar como antimicrobianos. En general, estas moléculas de origen natural deben cumplir con los siguientes criterios: (i) baja toxicidad, (ii) actividad específica y (iii) alta biodisponibilidad (Stan et al., 2021). Aunque la naturaleza de sus efectos inhibitorios aún no está completamente clara, se ha establecido que estos compuestos actúan contra diversos microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento (Quintero *et al.*, 2017). De esta manera, estos compuestos tienen el potencial de ser utilizados para prevenir y tratar una amplia variedad de infecciones en los seres humanos, los animales e incluso las plantas ya que está demostrado que los compuestos antimicrobianos naturales aislados a partir de animales y microorganismos tienen un buen efecto inhibitorio ante una amplia variedad de patógenos (Stan et al., 2021).

1.2 Tratamiento con antibióticos

El tratamiento con antibióticos ha tenido un gran impacto en disminuir la morbilidad y mortalidad producida por infecciones susceptibles que, de ser tratadas a tiempo, disminuyen el desarrollo de enfermedades y las complicaciones que de ellas pudieran presentarse (WHO, 2023). Desde el inicio del uso clínico de antibióticos a finales de la primera mitad del siglo XX, se identificó que había especificidad de los mismos antibióticos para ejercer su efecto contra diferentes bacterias de manera natural, fenómeno conocido como resistencia intrínseca, así se ha determinado que algunas bacterias por especie eran previamente sensibles al efecto de un antibiótico específico (CDC, 2019), tal es el caso de *S. aureus* que puede producir penicilinasas, esta enzima puede hidrolizar el anillo β -lactámico de la penicilina, y de esta manera genera resistencia a la penicilina de manera intrínseca (Rayner et al., 2005).

1.3 Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) aparece cuando los microorganismos buscan la forma de sobrevivir y adquieren así la capacidad de adaptarse a su entorno de forma natural (Svarech et al., 2024). Algunos autores plantean que los mecanismos de resistencia bacteriana se pueden categorizar en tres grupos o líneas de defensa, según los sitios de acción para esta resistencia (Figura 1). (Zhou et al., 2013)

2. ANTECEDENTES

2.1 Líneas de defensa de la resistencia antimicrobiana

La primera línea de defensa son las biopelículas bacterianas (Costerton et al., 1995) cuya acción es limitar la entrada de los antibióticos al interior de la célula (Figura 1). La segunda línea de defensa la conforman la pared celular, membrana celular y bombas de eflujo (proteínas encargadas de expulsar sustancias tóxicas), su actividad es limitar la asimilación de los antibióticos (Zhou et al., 2015), algunas bacterias como *Acinetobacter baumannii* cuentan con esta línea de defensa, esta bacteria tiene baja permeabilidad de membrana y además cuenta con tres principales bombas de eflujo (AdeB, AdeG y AdeJ) las cuales obstaculizan el efecto de los antibióticos (Jiménez et al., 2023).

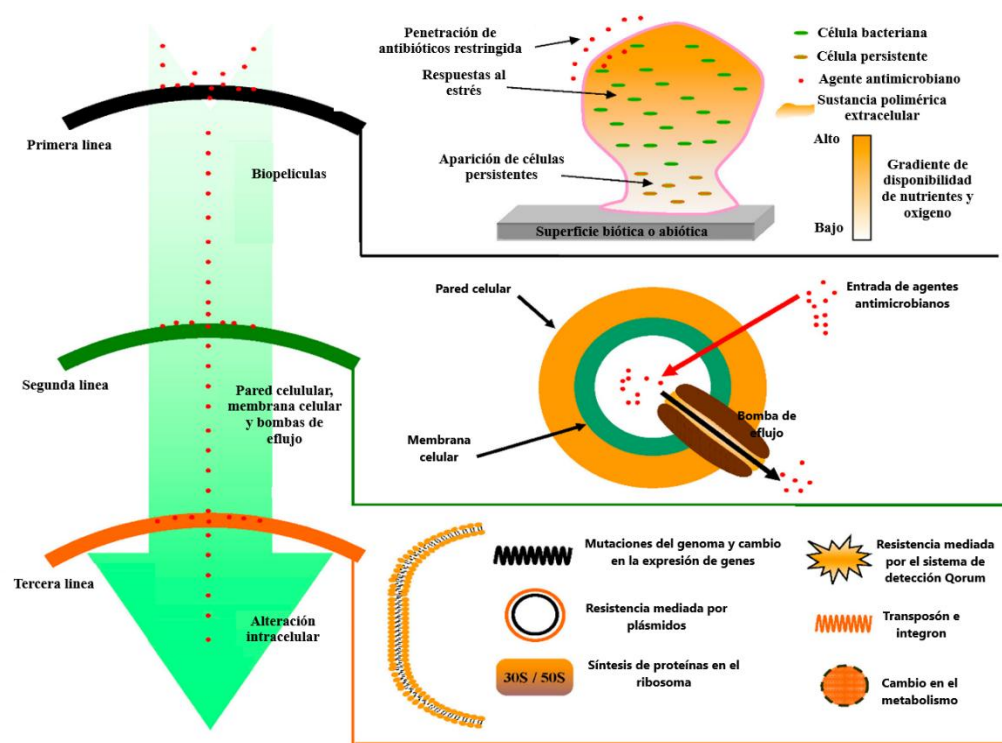


Figura 1. Representación gráfica de las tres líneas de defensa que generan RAM, en la primera línea las bacterias forman biopelículas, la segunda línea involucra la pared celular, membrana celular, las bombas de eflujo y por último en la tercera línea ocurren cambios genéticos y bioquímicos internos que afectan directamente el blanco del antibiótico. (Zhou et al., 2015).

La tercera línea de defensa implica la alteración de los sitios diana, la regulación de la expresión génica e incluso la producción de enzimas inactivantes (β -lactamasas). Se ha reportado, por ejemplo, que *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa e inmóvil de alto interés clínico, desarrolla resistencia a las sulfonamidas (Figura 2), mediante el incremento en la producción de ácido paraaminobenzoico (PABA), el cual es un análogo estructural de las sulfonamidas, posteriormente el PABA desplaza competitivamente

a las sulfonamidas, el aumento inusual en la producción de PABA generado por *Staphylococcus aureus*, se debe a mutaciones en el gene regulador de la vía biosintética del fosfato (Elufisan et al., 2012; Zhou et al., 2015).

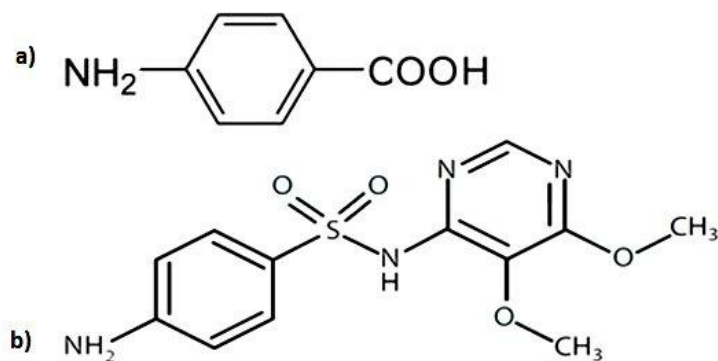


Figura 2. Homología estructural entre el a) Acido para-aminobenzoico y b) la Sulfadoxina (WHO, 2010).

Por otra parte, la RAM se ve favorecida por el uso inadecuado de los antimicrobianos en medicina humana, la falta de cuidados preventivos y el mal manejo de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. Otros aspectos por considerar en el retraso del diagnóstico microbiológico son, entre otros: los tratamientos incompletos por los pacientes, la ausencia de nuevos antimicrobianos, y la falta de higiene, entre otros factores que complican los esfuerzos mundiales para su contención (WHO, 2015).

2.2 Péptidos

Los péptidos son biomoléculas naturales que podemos encontrar en todos los organismos vivos y que son fundamentales en todo tipo de actividad biológica, al igual que las mismas proteínas (Nelson y Cox, 2017). Existen 20 aminoácidos (aa) naturales (Figura 3) los cuales se pueden combinar de manera aleatoria para generar una inmensa variedad de moléculas con diversas propiedades biológicas (Vélez et al., 2021).

La actividad biológica que desempeña un péptido depende de los aminoácidos que lo componen, de esta manera la distribución de cada residuo determina el tipo de estructura y las propiedades fisicoquímicas que esta adquiere. En el contexto de aquellos péptidos con actividad antimicrobiana, las propiedades fisicoquímicas de estos determinan a su vez cómo así son capaces de interactuar con la membrana celular, inhibir alguna actividad enzimática, alguna hormona o ciertos metabolitos (Téllez y Castaño, 2010). Los péptidos antimicrobianos (PAM) generalmente tienen carga positiva (la cual oscila entre +1 y +9), un porcentaje de hidrofobicidad que oscila entre el 40% y el 60%, punto isoeléctrico cercano a $pI = 10$, lo que confirma su carácter catiónico (Dathe et al., 2001). La característica principal de los PAM es su anfipilicidad, propiedad directamente relacionada con la composición y distribución de cada residuo en la cadena peptídica (Fong-Coronado et al., 2024).

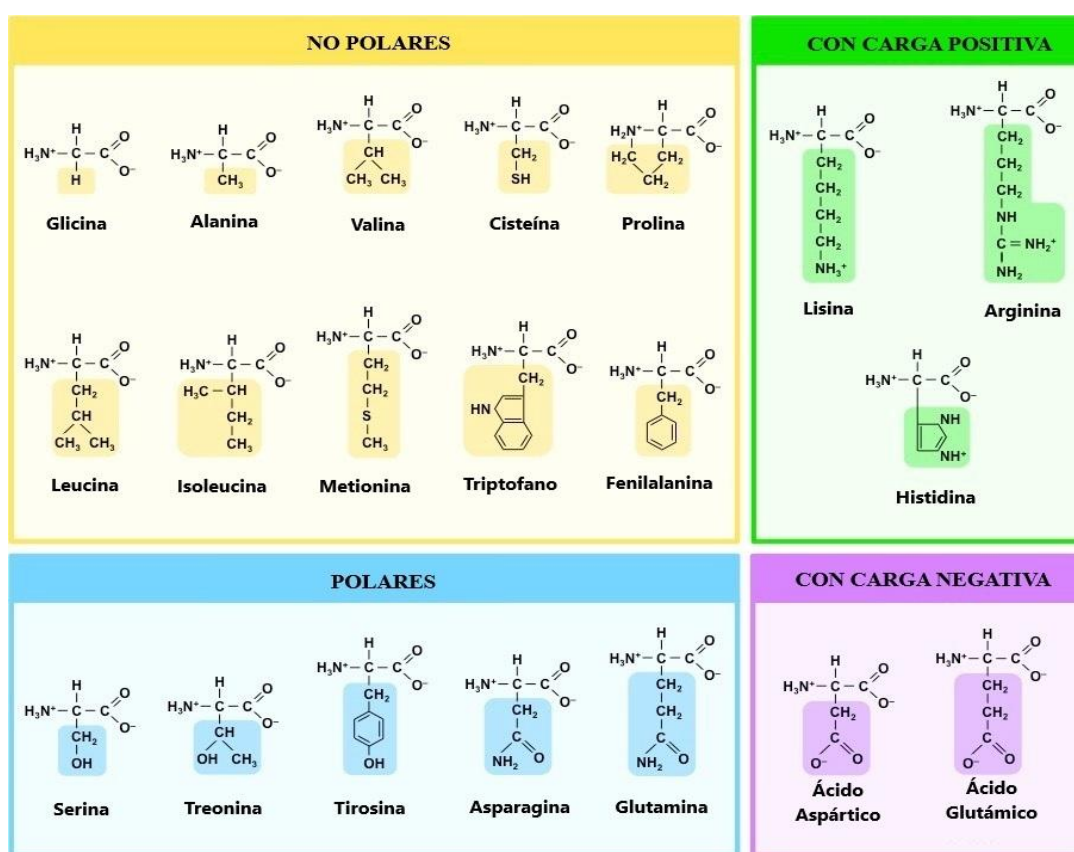


Figura 3. Aminoácidos naturales agrupados por las propiedades químicas de su grupo lateral (R).

2.3 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

Cada PAM tiene un mecanismo de acción diferente, se ha estudiado el mecanismo de acción de los PAM pero los hallazgos no son satisfactorios porque los mecanismos son extremadamente diversos, uno de los modelos más ampliamente aceptados para explicar el mecanismo de acción general de los PAM (Figura 4) es el que ellos son capaces de interactuar con la membrana celular bacteriana y alterar su integridad, lo que resulta directa o

indirectamente en la lisis celular (Raheem y Straus, 2019; Kumar et al., 2018; Florin et al. 2017). Los PAM también pueden tener actividades de mayor complejidad, como lo es la inhibición metabólica y traduccional (Gagnon et al., 2016). Por otro lado, el estudio de los PAM se ha basado en la identificación, aislamiento y purificación de péptidos de origen natural provenientes de diversos organismos y el explorar su mecanismo de acción puede ayudar a generar variantes con actividades optimizadas y tratar de desarrollar nuevas opciones farmacológicas (Luo y Song, 2021).

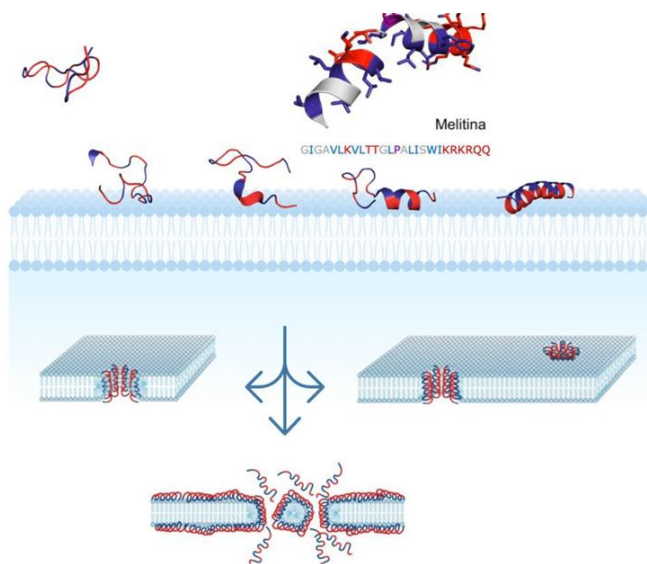


Figura 4. Efecto disruptor de la melitina, un PAM con estructura secundaria de hélice alfa presente en el veneno de las abejas. El efecto se da cuando el PAM interactúa con la membrana celular promoviendo la formación de poros acuosos a través de efectos parecidos a los de un detergente (proceso denominado micelización) lo cual desestabiliza la célula provocando lisis o muerte celular. (tomado de Fong-Coronado et al., 2024).

Para determinar el efecto antimicrobiano de los péptidos, se realizan estudios donde estos se aplican a microorganismos patógenos y se observa si hay una inhibición de la proliferación celular; asimismo se analiza su interacción con células humanas para descartar la posibilidad de un efecto no deseado (Ramírez et al., 2023). En este contexto la situación actual de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas. Los PAM han surgido en los últimos 25 años como una familia de sustancias con gran potencial para uso clínico, debido a sus múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia (Téllez y Castaño, 2010).

2.4 Veneno de alacranes

El veneno de los alacranes posee una gran variedad de componentes bioactivos (Figura 5), entre los cuales existen diferentes tipos de toxinas que se encargan de modular la función de canales iónicos y receptores en membranas de células excitables, estas toxinas provocan los múltiples síntomas conocidos de envenenamiento (Quintero et al., 2017). De estos venenos también se ha aislado una cantidad enorme de péptidos bioactivos contra

bacterias, hongos, levaduras y virus (Figura 5). Sin embargo, hoy en día han sido evaluados relativamente pocos péptidos con actividad antimicrobiana a partir del veneno de alacranes, contra cepas bacterianas multirresistentes (Quintero et al., 2017). Por citar algunos ejemplos se puede referir la hadrurina de *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios et al. 2000), la parabutoporina de *Parabuthus schlechteri* (Verdonck et al. 2000), la scorpina de *Pandinus imperator* (Conde et al. 2000), los péptidos IsCTs de *Opisthacanthus madagascariensis* (Dai et al. 2001) y las pandinina presentes también en el veneno de *P. imperator* (Nomura et al. 2001).

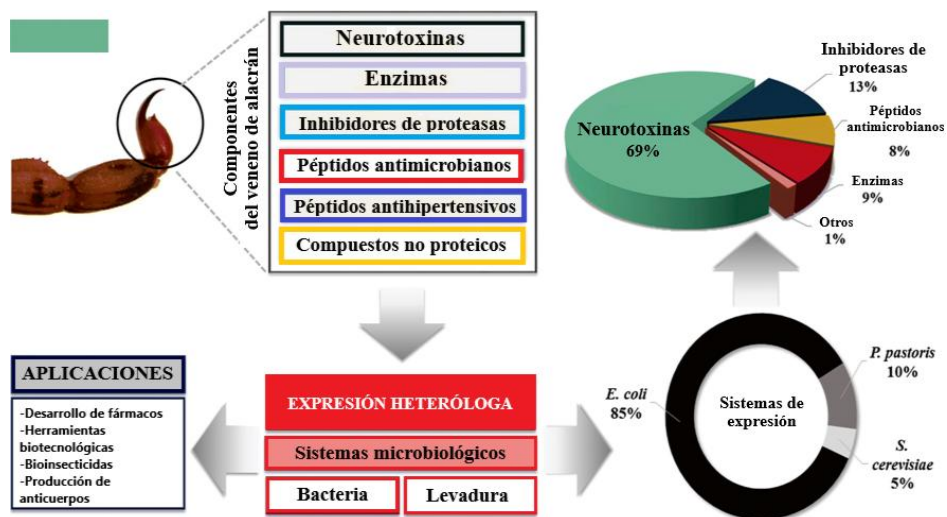


Figura 5. Componentes del veneno de alacrán y sus aplicaciones para combatir diversos patógenos bacterianos. El veneno de alacrán está compuesto principalmente por neurotoxinas y un porcentaje menor de biomoléculas entre las cuales aproximadamente un 8% son PAM que se pueden producir a partir de sistemas de expresión como *E. Coli* para aplicaciones biotecnológicas como el desarrollo de fármacos (Amorim et al., 2018).

2.5 Uso de los venenos en la industria farmacéutica

Los venenos siguen siendo un recurso infrutilizado para el descubrimiento de nuevos fármacos dentro de la industria farmacéutica a pesar de una trayectoria de muchos años proporcionando compuestos importantes para la generación de fármacos de gran éxito como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), como el Captopril® (Figura 5) medicamento usado para el tratamiento de la hipertensión, creado a partir del nonapéptido trepótida que fue aislado del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* (Ferreira et al 1965) y el primer compuesto mimético de la incretina, hormona producida en el intestino en respuesta a la ingesta de alimento y que actúa potenciando la secreción de insulina, llamado exenatida (Figura 6) una forma sintética de exendina-4, péptido que se aisló del veneno del lagarto monstruo de Gila para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Migdalof et al., 1984; Iltz et al., 2006).

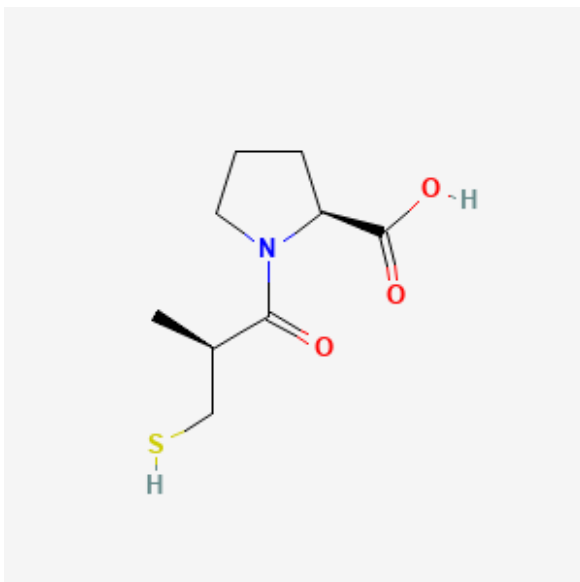


Figura 6. Estructura química del Captopril (NCBI, 2024)

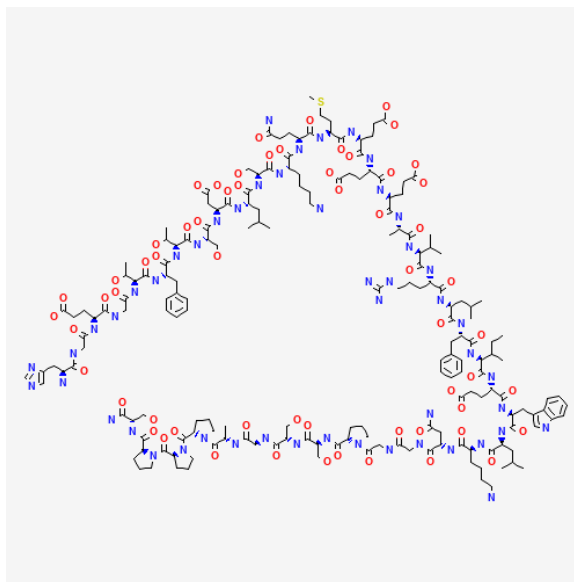


Figura 7. Estructura química de la Exenatida (NCBI, 2024)

Bajo este contexto, se puede decir que los PAM derivados de venenos han demostrado tener actividades biológicas prometedoras y potencial para la generación de potentes agentes antimicrobianos mediante un diseño racional (Ageitos et al., 2022). En resumen, los AMP están ampliamente distribuidos en los venenos de alacrán y poseen un espectro relativamente estrecho de actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Entre muchos otros ejemplos, recientemente se evaluó el efecto antibacteriano in vitro del veneno del alacrán *Hadruroides charcasus* frente a cepas de *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, donde se comprobó que estos péptidos tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tales patógenos (Pérez et al., 2019).

2.6 Propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos aislados en venenos de alacrán

Los PAM en su mayoría son moléculas cortas, anfifílicas y altamente catiónicas (Bahar y Ren, 2013) con alta solubilidad y bajo peso molecular (Li et al., 2019). Estas propiedades determinan así que tales péptidos se reconfiguren estructuralmente al momento de entrar en contacto con la bicapa lipídica, y de esta manera faciliten la formación de poros acuosos en la membrana de los microorganismos, lo que altera su permeabilidad y provoca la muerte celular (Agawa et al., 1991). Por otro lado, los PAM encontrados en el veneno de los alacranes, al ser generalmente cortos (13-25 aa) y poseer una modificación química que consiste en la presencia de su grupo amida en su extremo C-terminal, exhiben actividad antimicrobiana que puede explicarse en función de los mismos parámetros, particularmente modulando su grado de helicidad (Zeng et al., 2013; Quintero et al., 2017; Salazar-Hernandez et al., 2023). Además, es importante mencionar que los PAM pudieran ser empleados como

agentes terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas y/o complementar los tratamientos terapéuticos para combatirlos de la mano del uso de antibióticos convencionales, pues se ha reportado que tienen efectos sinérgicos favorables con estos (De La Fuente et al., 2015).

Un ejemplo de lo dicho anteriormente lo constituye un péptido lineal citotóxico del alacrán *Opisthacanthus madagascariensis* (Figura 8), el cual se denominó IsCT. Este es un péptido de 13 residuos de aa, cuya secuencia primaria es la siguiente: ILGKIWEGIKSLF-NH₂. La caracterización de este péptido exhibió baja actividad hemolítica y alta actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, lo que indicó inmediatamente su alto potencial terapéutico (Dai et al., 2001). Hasta la fecha, se han reportado 134 PAM cortos de veneno de diversas especies de alacrán, formados por menos de 20 residuos de aa, en la Base de Datos de Actividad Antimicrobiana y Estructura de Péptidos, DBAASP (<https://dbaasp.org>) (Fong-Coronado et al., 2024).

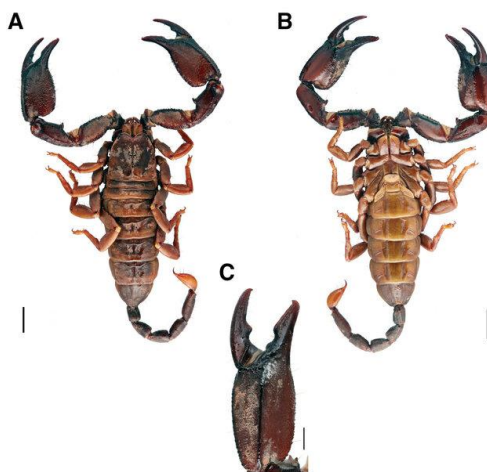


Figura 8. Imagen del alacrán *Opisthacanthus madagascariensis* femenino, A) aspecto dorsal de cuerpo, B) aspecto ventral del cuerpo, C) aspecto retrolateral de la pinza que ilustra los márgenes dentados. Barras de escala: 10 mm (A–B), 5 mm (C). (Monod et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, el principal atributo de estos péptidos antimicrobianos en general es su carácter catiónico, lo que significa que tienen carga neta positiva a pH fisiológico (7.2 – 7.4) debido a un alto contenido de arginina y lisina en relación con la presencia de ácido aspártico y ácido glutámico (Hancock y Sahl, 2006). Por otra parte, los PAM adoptan estructuras anfipáticas en medios acuosos con una cara hidrofóbica opuesta a otra de carácter hidrofílica, lo que les confiere propiedades para interaccionar y causar alteraciones en las membranas, algunos modelos propuestos son el modelo de duela de barril,

el modelo de poro toroidal y el de alfombra Figura 9 (Ahmed y Hammami, 2019; Kumar et al., 2018).

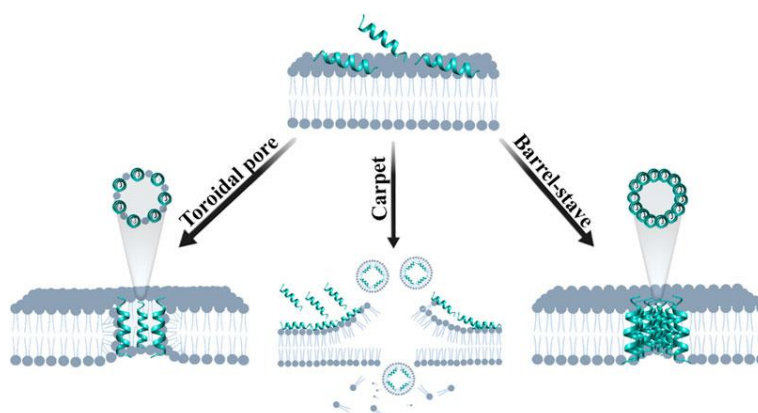


Figura 9. Modelos esquemáticos de los principales mecanismos de acción propuestos para los PAM sobre las membranas celulares de los microorganismos. En el modelo toroidal, los péptidos inducen una curvatura del lípido formando un poro continuo en forma de toro; el interior está revestido por péptidos y cabezas lipídicas. En el modelo de alfombra, los péptidos se acumulan paralelamente sobre la membrana (como una “alfombra”) y al superar una concentración umbral, causan disrupción y fragmentación, tipo detergente. El modelo Barrel-Stave los péptidos se insertan perpendicularmente formando un poro tipo barril rodeado sólo por los péptidos. (tomado de Amorim-Carmo et al., 2022).

Los alacranes son animales venenosos, conocidos por sus efectos adversos causados al interactuar de manera accidental con los seres humanos ya que su veneno transmite una variedad de toxinas perjudiciales con diversas actividades fisiológicas que pueden ser desde síntomas leves como la dermatitis y ciertas respuestas alérgicas menores y hasta síntomas graves como las enfermedades relacionadas a la coagulación (Shah P. et al., 2018). En la actualidad se cuenta con amplios estudios y reportes que se enfocan en el estudio de los péptidos con actividad antimicrobiana con la finalidad buscar sintetizarlos, como también la variación en su estructura química para evaluar su capacidad antimicrobiana (Pérez O et al., 2019).

Así, el veneno de estos artrópodos representa una nueva fuente de PAM con actividades de amplio espectro. Un caso específico es el correspondiente a los PAM Uy234, Uy17, Uy192, AcrAP1 y AcrAP2 encontrados en los venenos de los alacranes *Urodacus yaschenkoi* (Figura 10) y *Androctonus crassicauda* (Figura 11) respectivamente. Estos péptidos mostraron una alta actividad antimicrobiana contra los aislados clínicos de bacterias multidrogasresistentes (MDR) como se muestra en la tabla 1 (Cesa-Luna et al., 2019; Du et al., 2014).



Figura 10. Imagen del alacrán *Urodacus yaschenkoi* (Jennings J. et al., 2009).



Figura 11. Imagen del alacrán *Androctonus crassicauda* (Rouhullah, D. y Behrooz, F. 2012).

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de los PAM's sobre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y una levadura. (Cesa-Luna et al., 2019; Du et al., 2014)

Cepa bacteriana	CMI (μM) \pm error estándar					Referencia
	Uy234*	Uy17	Uy192	AcrAP1	AcrAP2	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	190	186.2	>339.3	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	29.6 \pm 25	23.2	42.4	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Streptococcus sp. SP10</i>	2.9	23.2	10.6	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Streptococcus sp. ST9</i>	5.9	11.6	15.9 \pm 7	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	ND	16	16	Du et al., (2014)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	8	8	Du et al., (2014)

Para una comprensión completa de su potencial terapéutico, es importante tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los PAM con un análisis composicional completo que incluya los diferentes parámetros fisicoquímicos y estructurales asociados con estas moléculas bioactivas, y de esta manera crear la propuesta de un marco teórico para el diseño de nuevos fármacos (Fong-Coronado et al., 2024). En resumen, los péptidos encontrados en los venenos de múltiples alacranes se consideran una alternativa a la terapia contra bacterias multirresistentes, ya que constituyen todo un arsenal de biomoléculas con diferente peso molecular, estructura, química variable y a través de herramientas biotecnológicas, pueden ser analizados con la finalidad de potenciar su actividad a través de las modificaciones en su composición química (Pérez et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento de microorganismos multirresistentes a nivel mundial y la limitación de antimicrobianos efectivos contra estos patógenos, la RAM se considera una amenaza mundial y un problema crítico en términos de salud humana ya que el riesgo de propagación y persistencia de enfermedades infecciosas está en constante aumento.

La RAM a múltiples fármacos no solo amenaza la vida de los pacientes, sino también aumenta la estancia hospitalaria y el tiempo de uso de los medicamentos, lo que a su vez se traduce en un aumento del gasto económico para los pacientes (Haiyang y Quiñones, 2021). Como alternativa, algunos PAM ya son usados en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos multirresistentes, mientras tanto otros se encuentran en fases experimentales para mejorarlos y comercializarlos, por ejemplo, el Pexiganan[®], un péptido modificado a partir de la magainina del veneno de ranas *X. laevis*, el cual se emplea contra la mayoría de las bacterias aerobias Gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae, algunos hongos como *Candida* spp. y otras bacterias como *Cryptococcus*, y *Pneumocystis carinii* (De Lucca Y Walsh, 1999). Es así como el desarrollo de nuevos fármacos está

directamente asociado a explotar el gran potencial que tienen los PAM presentes en diversas especies de alacranes, y que aún no se han estudiado lo suficiente. Por otra parte dada su actividad biológica y el hecho de que al ser tan pequeños se facilita su síntesis química (Fong-Coronado et al., 2024); además, los análisis predictivos de la actividad de estos péptidos resultan fundamentales para contribuir con métodos para el diseño racional, mediante el uso de secuencias consenso o plantillas para identificar aquellos péptidos en los que observa un mayor potencial en términos de su actividad antimicrobiana (Samael et al., 2018; Fong-Coronado et al., 2024).

Por tanto, el potencial y aplicaciones de los PAM de alacranes son casi ilimitados, ya que en la naturaleza se han caracterizado multitud de estas moléculas; además, estos se pueden sintetizar y modificar para obtener millones de posibles opciones de péptidos con actividades biológicas optimizadas (Samael et al., 2018).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Generar modelos estructurales de alta calidad para los siguientes péptidos: Uy234, Uy192, Uy17 de *Urodacus yaschenkoi* y AcrAP1, AcrAP2 de *Androctonus crassicauda* y evaluar su potencial farmacológico en términos de sus propiedades conformacionales.

4.2 Objetivos específicos

- Calcular los siguientes parámetros fisicoquímicos para cada modelo: Carga neta, potencial electrostático, momento hidrofóbico, momento dipolar, flexibilidad intrínseca, índice de Boman.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular en fase acuosa para cada modelo en períodos de 100ns.
- Realizar un estudio de combinatoria sin repetición para cada modelo generado en términos del RMSD (*root mean square deviation*) para determinar así el grado de libertad conformacional de cada péptido en fase acuosa.
- Contrastar los datos conformacionales con la bioactividad de cada péptido en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en cepas de *S. aureus* reportadas en literatura
- Proponer un sistema de interacción péptido/lípido para cada modelo flexibilizado (Uy234, Uy192, Uy17, AcrAP1, AcrAP2) en términos de su libertad conformacional.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



Figura 12. Diagrama de trabajo dividido en secciones.

6. MATERIALES

6.1 Herramientas bioinformáticas:

AlphaFold, BioEdit, PyMOL, Heliquist, FlexiProt, WebGro, Molprobit.

6.2 Material biológico:

Cotejo de datos de inhibición para cada péptido previamente reportados en la literatura.

6.3 Equipos

Computadora con conexión a internet y que cumpla los siguientes requisitos básicos:

- Un sistema operativo compatible, como Windows 10 o posterior, macOS 12 o posterior, o Linux.
- Una tarjeta gráfica que admita OpenGL.
- Una cantidad mínima de memoria RAM.
- Un ratón de tres botones o tipo "*wheel*".

7. MÉTODOS

7.1.1 Predicción de las estructuras de los cinco péptidos cortos seleccionados.

AlphaFold2 es un sistema de inteligencia artificial que se especializa en la predicción de la estructura tridimensional de péptidos y proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos.

7.1.2 Alineamiento de los péptidos seleccionados

BioEdit es un editor de alineación de secuencias biológicas que ayuda a la manipulación de secuencias desde la computadora.

7.1.3 Creación de un logo de secuencia

WebLogo es una aplicación web diseñada para la generación de logotipos a partir de secuencias de péptidos y proteínas previamente alineadas, con el fin de obtener una representación gráfica de una alineación de secuencias.

7.1.4 Visualización de los modelos generados

PyMOL es un *software* de visualización molecular muy utilizado que permite a los investigadores visualizar y manipular estructuras tridimensionales de moléculas, como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y complejos macromoleculares.

7.1.5 Cálculo de hidrofobicidad, momento hidrofóbico y carga neta

HeliQuest es un servidor web usado para calcular a partir de una secuencia, sus propiedades fisicoquímicas, con el fin de identificar segmentos de proteínas que posean características similares.

7.1.6 Cálculo de la flexibilidad intrínseca

FlexiProt es una herramienta que calcula la flexibilidad intrínseca de secuencias primarias de proteínas, lo que permite evaluar este parámetro estructural para péptidos cortos, lo que es importante para comprender cómo interactúan con otras moléculas, como los lípidos.

7.1.7 Simulaciones de Dinámica Molecular

Evaluación de la libertad conformacional para cada péptido, en fase acuosa y mediante el uso del campo de fuerza Gromos96-43a1

7.1.8 Cálculo del momento dipolar

Protein Dipole Moments es un servidor web que calcula el momento dipolar de secuencias primarias a partir del modelo generado en formato “pdb”. Con el cálculo del momento dipolar del modelo inicial y el valor calculado para cada simulación se puede realizar la estimación del porcentaje de orden estructural que conserva el modelo después de las simulaciones.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Alineamiento de secuencias

El alineamiento de las secuencias es de gran utilidad para poder observar posiciones de residuos de aminoácidos que pueden ser similares respecto a las secuencias de los demás PAM.

```
Uy17    ---ILSAIWSGIKGLL----
Uy192   ---FLSTIWNGIKGLL----
Uy234   FPFLLSLIPSAIS-AIKRL-
AcrAP1  --FLFSLIPHAI SGLISAFK
AcrAP2  --FLFSLIPNAISGLLSAFK
```

Figura 13. Alineamiento de secuencias para los PAM Uy17, Uy192, Uy234, AcrAP1, AcrAP2.

Las secuencias alineadas denotan ciertas zonas conservadas por algunos residuos de aminoácidos a pesar de ser de diferentes tamaños, a partir de esto se puede intuir que la posición de ciertos residuos es de gran relevancia para que los péptidos puedan tener alguna actividad biológica.

8.2 Logo generado.



Figura 14. Logo generado para las secuencias alineadas de los PAM Uy17, Uy192, Uy234, AcrAP1, AcrAP2, el logo representa la frecuencia de cada residuo de aminoácidos en bits por posición. Se observa predominancia de residuos de Serina en la posición 5, predominancia de residuos de Isoleucina en las posiciones 7 y 11, mientras que en la posición 8 se observa la presencia de residuos de Prolina (Estigmurinas) y Triptófano (Pantíninas).

En el logo se observa la presencia de dos tipos de residuos muy interesantes, las prolinas (P) y los triptófanos (W), estos residuos se ubican aproximadamente en el centro de las secuencias y toman gran relevancia ya que todos los péptidos analizados tienen estructura de alfa hélice y puede ser desestabilizada debido a la presencia de estos residuos. Por su parte la prolina a pesar de ser un residuo pequeño irrumpe en la formación de puentes de hidrógeno con respecto a los residuos de aminoácidos adyacentes y el triptófano al tener una cadena lateral R de gran tamaño, puede generar una tendencia a desestabilizar la estructura debido al impedimento estérico con las demás cadenas laterales.

8.3 Propiedades fisicoquímicas de cada péptido

En la tabla 2. se resumen los datos obtenidos de las propiedades fisicoquímicas calculadas para cada PAM.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas calculadas.

PEPTIDOS	COMPOSICION	GRAVY	μ (Debye)	mBf	<H>	μ H	Carga neta	Índice de Boman (kcal/mol)	Potencial electrostático ϕ (kJ/mol)
Uy17	ILSAIWSGIKGLL-NH2	1.50	151	1.69	0.922	0.66	1	-1.78	1.06 E4
Uy192	FLSTIWNGIKGLL-NH2	0.97	153	1.80	0.875	0.71	1	-1.04	8.94 E3
Uy234	FPFLLSLIPSAISAIKRL-NH2	1.33	115	1.79	0.873	0.47	2	-0.74	1.15 E4
AcrAP1	FLFSLIPHAISGLISAFK-NH2	1.41	171	1.60	0.902	0.44	1	-1.25	1.16 E4
AcrAP2	FLFSLIPNAISGLLSAFK-NH2	1.36	172	1.69	0.856	0.47	1	-1.14	1.23 E4

En la tabla se puede observar que las principales características de los PAM es su carga positiva, además de un valor de índice de Boman ligeramente bajo, esto indica que tienen una baja capacidad de interacción con otras moléculas, el momento dipolar indica un alto orden estructural, así como la consolidación de vectores dipolares en cada estructura y el índice de GRAVY la anfipaticidad de cada secuencia, siendo los valores cercanos a cero particularmente hidrofílicos y los que se alejan de cero hacia valores cada vez más positivos, más hidrófobos.

8.4 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Se realizó un cotejo de datos sobre las concentraciones mínimas inhibitorias en artículos que han estudiado anteriormente el efecto terapéutico de los 5 péptidos sobre cepas de bacterias MDR, los datos encontrados fueron descargados en la tabla 3, los estudios sobre las CMI fueron hechos sobre bacterias gram positivas, gram negativas y una levadura.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de 5 péptidos antimicrobianos sobre cepas de bacterias MDR.

Cepa bacteriana	CMI (μM) \pm error estándar					Referencia
	Uy234*	Uy17	Uy192	AcrAP1	AcrAP2	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	190	186.2	>339.3	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	29.6 \pm 25	23.2	42.4	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	190	372.5	169.6	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Klebsiella</i> sp.	190	186.2	>339.3	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Burkholderia cepacia</i>	>380	>372.5	>339.3	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	95	23.2	10.6	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Streptococcus</i> sp. SP10	2.9	23.2	10.6	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Streptococcus</i> sp. ST9	5.9	11.6	15.9 \pm 7	ND	ND	Cesa-Luna et al., (2019)
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	ND	16	16	Du et al., (2014)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	8	8	Du et al., (2014)
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	>250	>250	Du et al., (2014)

*Péptido con mayor carga neta (+2).

Al observar los datos de CMI y la flexibilidad intrínseca de cada péptido (mBf, factor B promedio) es evidente que la flexibilidad es un parámetro de poca relevancia ya que entre los parámetros de flexibilidad son un tanto similares y no hay mucha diferencia como la que hay entre en las CMI.

8.5 Modelos estructurales generados

Cada modelo generado fue visualizado con ayuda del programa <PyMol>, esta herramienta permite visualizar estructuras de diferentes maneras, ya sea observando solo la cadena principal representada en: líneas, esferas, etc. o haciendo denotar ciertas características que se pueden considerar relevantes en el modelo estructural.

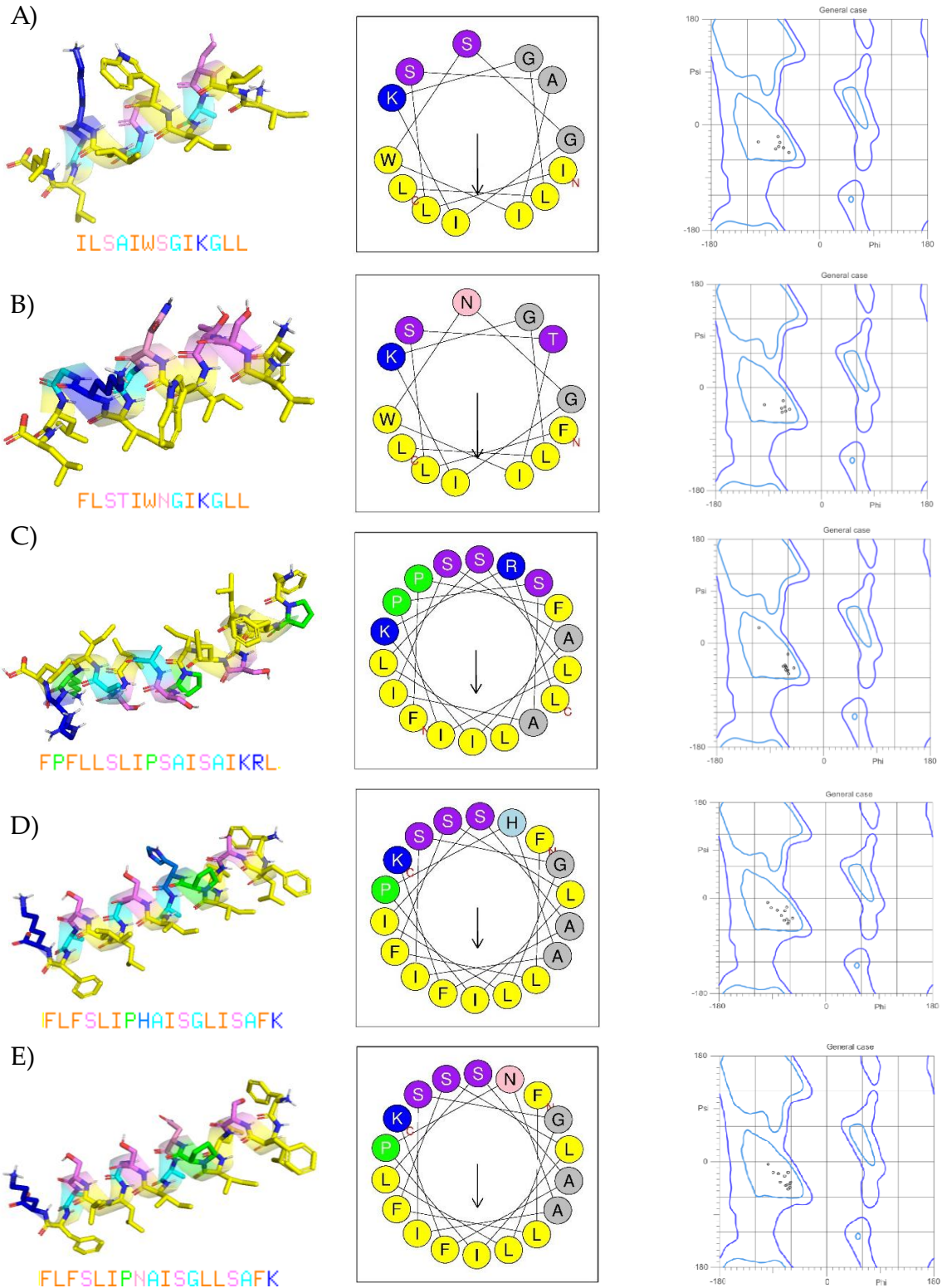


Figura 15. Modelos estructurales de los péptidos antimicrobianos A) Uy17, B) Uy192, C) Uy234, D) AcrAP1, E) AcrAP2, cada uno con su respectivo diagrama de rueda helicoidal y mapa de Ramachandran correspondiente, las letras rojas N y C en los diagramas de rueda helicoidal indican los extremos N y C respectivamente, las flechas negras indican el momento hidrofóbico (μH).

Al visualizar los modelos estructurales se puede observar de color amarillo la cara hidrofóbica de cada péptido, además en su diagrama de rueda helicoidal hay una flecha que indica el vector del momento hidrofóbico. Cada estructura fue validada mediante su diagrama de Ramachandran, en el cual todos los puntos de los aminoácidos que conforman el péptido se encuentran dentro de zonas permitidas, para ser más específico, en la región de la alfa hélice.

8.6 Simulaciones de cada péptido

Todos los péptidos fueron sometidos a tres simulaciones en periodos de 100ns cada uno, en las cuales se obtuvieron tres estructuras, estas fueron visualizadas contra la estructura original (Figura 61) con el fin de observar algún cambio conformacional y contrastarlo con su actividad antimicrobiana.

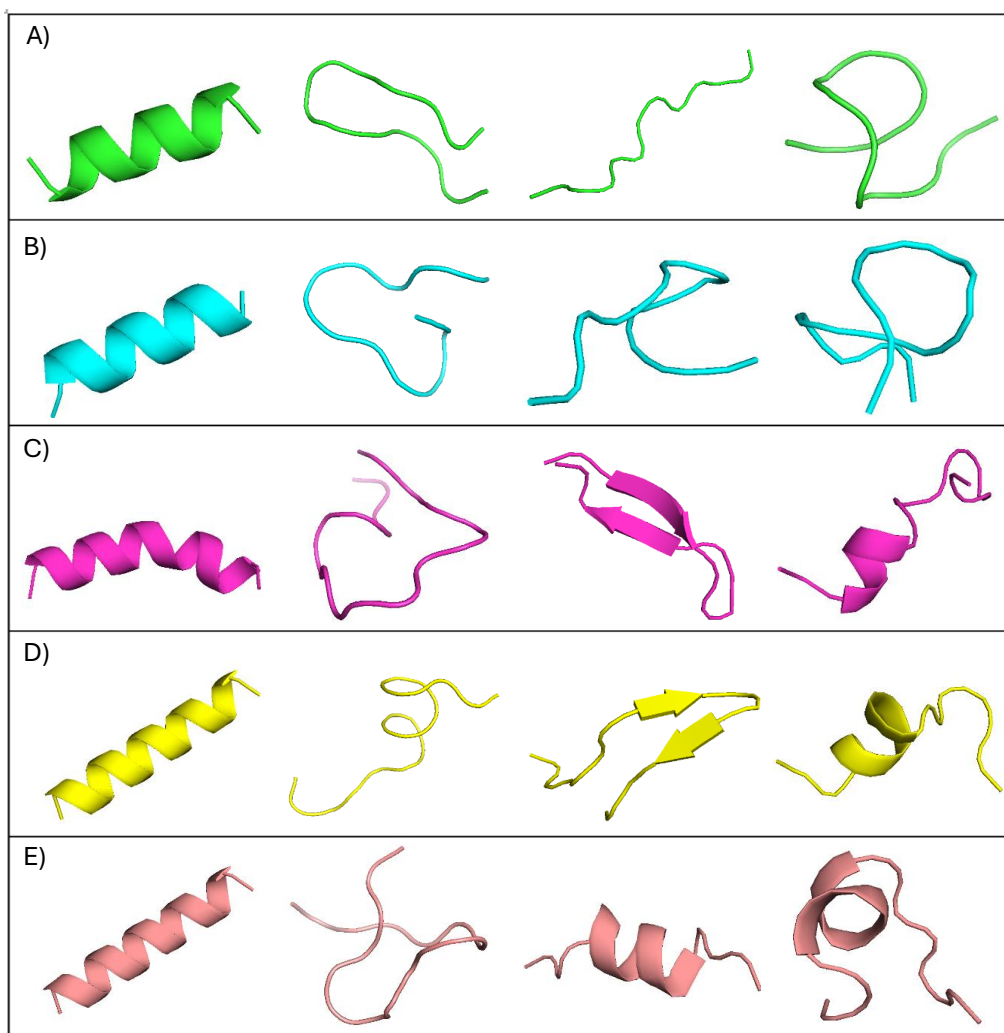


Figura 16. Péptidos antimicrobianos A) Uy17, B) Uy192, C) Uy234, D) AcrAP1, E) AcrAP2, y sus respectivas simulaciones (simulación A, B y C de izquierda a derecha en ese orden) en fase acuosa después de un periodo de 100ns.

La simulación en fase acuosa revela cómo el contacto del PAM con la membrana celular puede afectar la conformación del péptido. Por ejemplo, en las estructuras después de ser sometidas a simulación se observó que la presencia de agua estabiliza ciertas conformaciones, sino que también puede inducir la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los aminoácidos, lo que promueve interacciones que favorecen la formación de hélices alfa. Esta observación refuerza la idea de que las propiedades del entorno acuoso son esenciales para la activación de la bioactividad de los PAM.

Mientras que los PAM pertenecientes al grupo de las pantininas (Uy17, Uy192) obtuvieron un desorden total en su estructura, los PAM pertenecientes al grupo de las estigmurinas conservaron un porcentaje de orden, ya sea conservando una región en alfa hélice o cambiando de conformación parcialmente a laminar beta, este cambio estructural se puede deber a la presencia de la prolina, un aminoácido pequeño que desestabiliza la alfa hélice y que a su vez puede facilitar el cambio conformacional de la estructura y volver a generar una estructura secundaria. Por su parte las pantininas contienen triptófano, un residuo de gran tamaño en su cadena lateral R que puede generar un impedimento estérico con los demás residuos de la cadena peptídica y por lo tanto desestabilizar la estructura y no generar estructuras secundarias al contacto con la fase acuosa.

A partir del momento dipolar μ (Debye) de cada simulación se realizó el cálculo del porcentaje del momento dipolar de las simulaciones de cada PAM con el fin de observar que péptidos tuvieron una mejor conservación estructural, en la tabla 4 se resumen los datos de los cálculos.

Tabla 4. Cálculo del porcentaje conservación de orden de cada péptido a partir de su momento dipolar después de las simulaciones en periodos de 100 ns.

Péptidos	Tiempo 0	μ (Debye)			\bar{x}	Tiempo 0 -		
		Simulación A	Simulación B	Simulación C		\bar{x}	%	σ
Uy17	151	78	63	88	76.33	74.67	50.55	12.58
Uy192	153	25	79	61	55.00	98.00	35.95	27.50
Uy234	115	38	132	61	77.00	38.00	66.96	49.00
AcrAP1	171	45	111	69	75.00	96.00	43.86	33.41
AcrAP2	172	67	60	69	65.33	106.67	37.98	4.73

Los PAM Uy234 y AcrAP1 en su simulación “B” fueron los que obtuvieron un valor de momento hidrofóbico alto y en sus simulaciones se puede observar que fueron los únicos que mantuvieron parcialmente un orden estructural cambiando de conformación de alfa hélice a laminar beta durante la simulación. Los porcentajes de orden en algunos casos contrastan con las simulaciones, por ejemplo el PAM Uy234 tuvo un 66.9% de orden

estructural, en 2 de 3 de sus estructuras se estabilizaron parcialmente formando una estructura secundaria, el PAM AcrAP1 obtuvo un 43.8% (porcentaje bajo) pero se debe tomar en cuenta que su desviación estándar es alta ya que una de sus simulaciones perdió totalmente su orden y eso influyo significativamente en el resultado final, el porcentaje del PAM AcrAP2 fue 37.9% (porcentaje bajo) pero que al observar sus estructuras después de cada simulación se observa claramente que 2 de 3 simulaciones aún tienen estructura secundaria. Para los PAM Uy17 y Uy192 (pantininas) el promedio de conservación no rebaso el 51% lo cual se contrasta con las estructuras resultantes en las que ninguna conservo estructura secundaria. En el grafico 1 se puede observar de manera grafica como fue el cambio de conformación en base a su momento dipolar de cada una de las 3 simulaciones realizadas para cada péptido

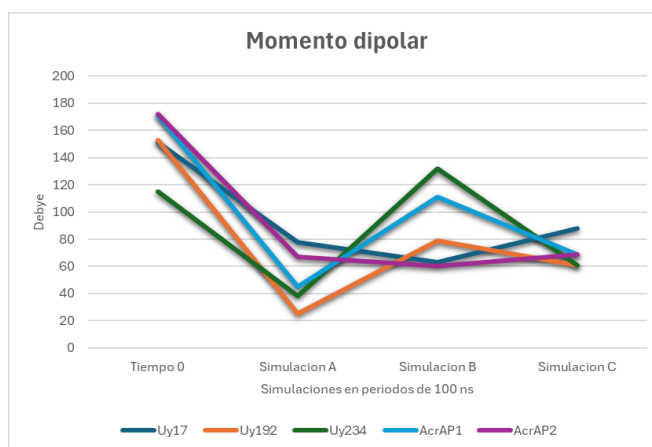


Gráfico 1. Momento dipolar de cada simulación realizada en periodos de 100 ns se puede observar que los péptidos se desordenan y reordenan un poco en cada simulación.

8.7 Coeficiente de bioactividad

Con los datos del potencial electrostático (ϕ , kJ/mol) y el momento hidrofóbico (μH), o la hidrofobicidad ($\langle H \rangle$), se puede calcular el coeficiente de bioactividad de cada péptido ($\phi/\mu H$, $\phi/\langle H \rangle$) y de esta manera realizar una comparación con las CMI de alguna bacteria MDR que tengan en común en la cual haya un efecto antimicrobiano reportado en la literatura. La bacteria MDR idónea para el estudio es *Staphylococcus aureus*, en la tabla 5 se resumen los datos usados para contrastar el potencial de bioactividad de cada PAM contra su efecto terapéutico sobre *Staphylococcus aureus*. Tenemos dos tipos de PAM las estigmurinas y las pantininas, por lo cual se realizaron los gráficos 2 y 3 para comparar el potencial de bioactividad entre los PAM y saber cuáles son más efectivos. Primero se realizaron los cálculos del potencial de bioactividad con el potencial electrostático y el momento hidrofóbico.

Tabla 5. Coeficiente de bioactividad calculado para cada PAM tomando en cuenta el potencial electrostático y el momento hidrofóbico (μH).

PEPTIDOS	Potencial electrostático ϕ (kJ/mol)	μH	Coeficiente de bioactividad	CMI ⁻¹ sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (μM)
Uy17	1.06 E4	0.661	1.6	0.043
Uy192	8.94 E3	0.706	1.26	0.023
Uy234*	1.15 E4	0.467	2.46	0.033
AcrAP1	1.16 E4	0.437	2.65	0.125
AcrAP2	1.23 E4	0.474	2.59	0.125

*Péptido con carga diferente a los demás.

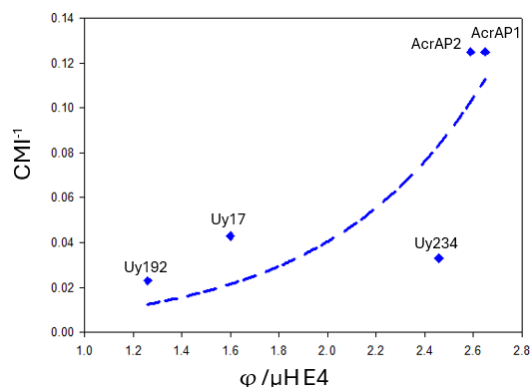


Gráfico 2. CMI vs Coeficiente de bioactividad calculado a partir del momento dipolar de cada PAM.

Los coeficientes de bioactividad de las estigmurinas fueron superiores a los de las pantininas, en este caso no se tomó en cuenta la estigmurina Uy234, ya que este PAM tiene carga superior a los demás PAM, y lo que se busca es un comparativo justo para una mejor interpretación de resultados. Es evidente que entre mayor sea el potencial de bioactividad, menor será la concentración del PAM para inhibir el crecimiento de *S. aureus*.

Posteriormente se realizó el cálculo del potencial de bioactividad con el potencial electrostático y la hidrofobicidad.

Tabla 6. Cálculo del potencial de bioactividad tomando en cuenta la hidrofobicidad ($\langle H \rangle$).

PEPTIDOS	Potencial electrostático ϕ (kJ/mol)	$\langle H \rangle$	Potencial de bioactividad	CMI ⁻¹ sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (μM)
Uy17	1.06 E4	0.922	1.14	0.043
Uy192	8.94 E3	0.875	1.02	0.023
Uy234*	1.15 E4	0.873	1.31	0.033
AcrAP1	1.16 E4	0.902	1.28	0.125
AcrAP2	1.23 E4	0.856	1.43	0.125

*Péptido con carga diferente a los demás.

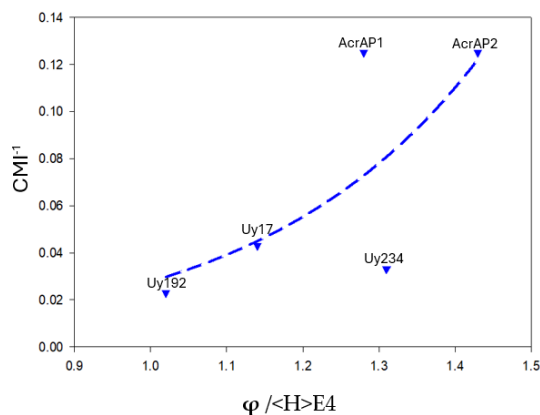


Gráfico 3. CMI vs Coeficiente de bioactividad calculado a partir de la hidrofobicidad de cada PAM.

El potencial de bioactividad calculado tanto con el momento dipolar como con la hidrofobicidad es capaz de reflejar la efectividad de los PAM frente a ciertas cepas bacterianas, ya que los datos indican que, a mayor potencial, menor será la CMI de cada péptido sobre las bacterias.

8.8 Análisis de combinatoria

Se realizó una combinatoria en pares para cada una de las simulaciones y posteriormente el alineamiento de los pares de estructuras en el programa PyMol, se obtuvieron datos de Root Mean Square Deviation (RMSD) a los cuales se procedió a calcular el promedio y desviación estándar de cada pareja, los datos fueron descargados en la tabla 7, estos datos indican cuales parejas de simulaciones obtuvieron un mayor o menor grado de desorden y se represente en el gráfico 4.

Tabla 7. Promedios y desviación estándar del RMSD para cada pareja en las simulaciones de cada péptido.

RMSD	Uy17		Uy192		Uy234		AcrAP1		AcrAP2	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Uy17	-	-	5.895	1.797	5.685	1.414	4.84	0.977	5.663	1.55
Uy192	-	-	-	-	4.646	0.328	4.871	1.494	5.364	0.837
Uy234	-	-	-	-	-	-	6.457	2.23	4.965	1.774
AcrAP1	-	-	-	-	-	-	-	-	8.121	1.877
AcrAP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Un valor bajo de RMSD indica que los pares de estructuras son similares, y por lo tanto las estructuras son parcialmente similares después de las simulaciones, mientras que las combinaciones con valores RMSD más altos, indican que los péptidos sufrieron un mayor

cambio en su estructura para ser visualizado de mejor manera se realizó un gráfico en donde se representa de manera ascendente cuales parejas fueron mejor conservadas.

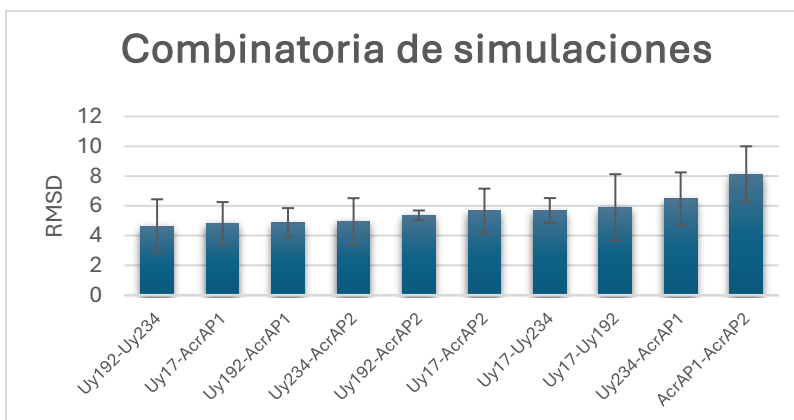


Gráfico 4. Valores promedio de los RMSD de las parejas de combinaciones de las simulaciones para cada péptido. El gráfico muestra de manera ascendente cuales parejas tuvieron un promedio de RMSD más alto (mayor diferencia estructural entre sí).

En el gráfico se representa que los péptidos cambiaron más de conformación durante la simulación en fase acuosa, cabe recalcar que para estos datos no se usó el modelo inicial de cada péptido, solo las simulaciones. Los péptidos más desordenados en este caso son el AcrAP1 y AcrAP2, curiosamente los dos péptidos con mejor efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* y que pertenecen a la misma especie de alacrán.

8.9 Visualización de las parejas de péptidos

Las parejas de péptidos que obtuvieron valores de RMSD más altos, fueron visualizadas y alineadas para observar que tipo de cambios sufrieron durante las simulaciones (Figura 17).

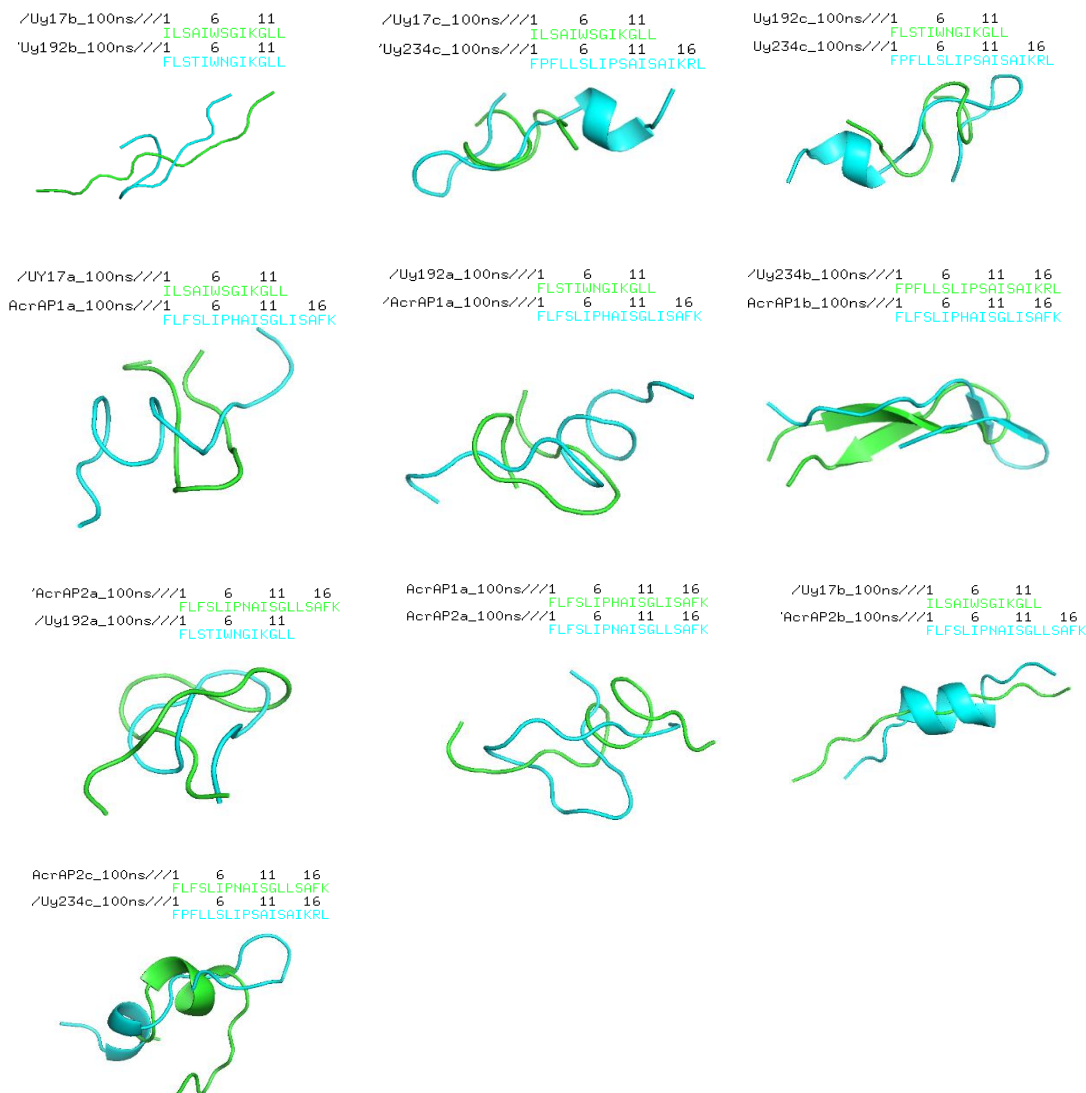


Figura 17. Modelos estructurales de las parejas de péptidos después de las simulaciones, que obtuvieron el valor de RMSD más alto, cada par de estructuras fue alineada en el programa PyMol para observar que estructuras sufrieron un mayor cambio conformacional y de esta manera relacionarlo a su actividad antimicrobiana.

Mientras que la combinatoria de los péptidos Uy192-Uy234 fue la que tuvo mayor similitud, la combinatoria de los péptidos AcrAP1-AcrAP2 fue la que tuvo mayor diferencia estructural, a pesar de que son casi idénticas excepto por un residuo, cabe señalar que estos péptidos pertenecen al grupo de las estigmurinas, lo cual debió haber influido en que el cambio de su estructura fuera mayor al de la demás.

8.10 Diagramas de Ramachandran

Cada péptido fue validado mediante su diagrama de Ramachandran, el cual fue comparado en un antes y después de las simulaciones realizadas en fase acuosa (Figura 64), en algunos casos los modelos cambiaron parcialmente su estructura de conformación de alfa hélice a laminar beta o simplemente formaron una conformación al azar.

Las regiones preferidas, como las zonas α hélices y β plegada, están bien representadas, indicando que los péptidos con mayor potencial de bioactividad tienden a adoptar parcialmente estructuras secundarias estables en condiciones acuosas. Esto es importante, ya que a partir de esto se puede decir que las configuraciones estables son generalmente las que tienen una mayor actividad antimicrobiana.

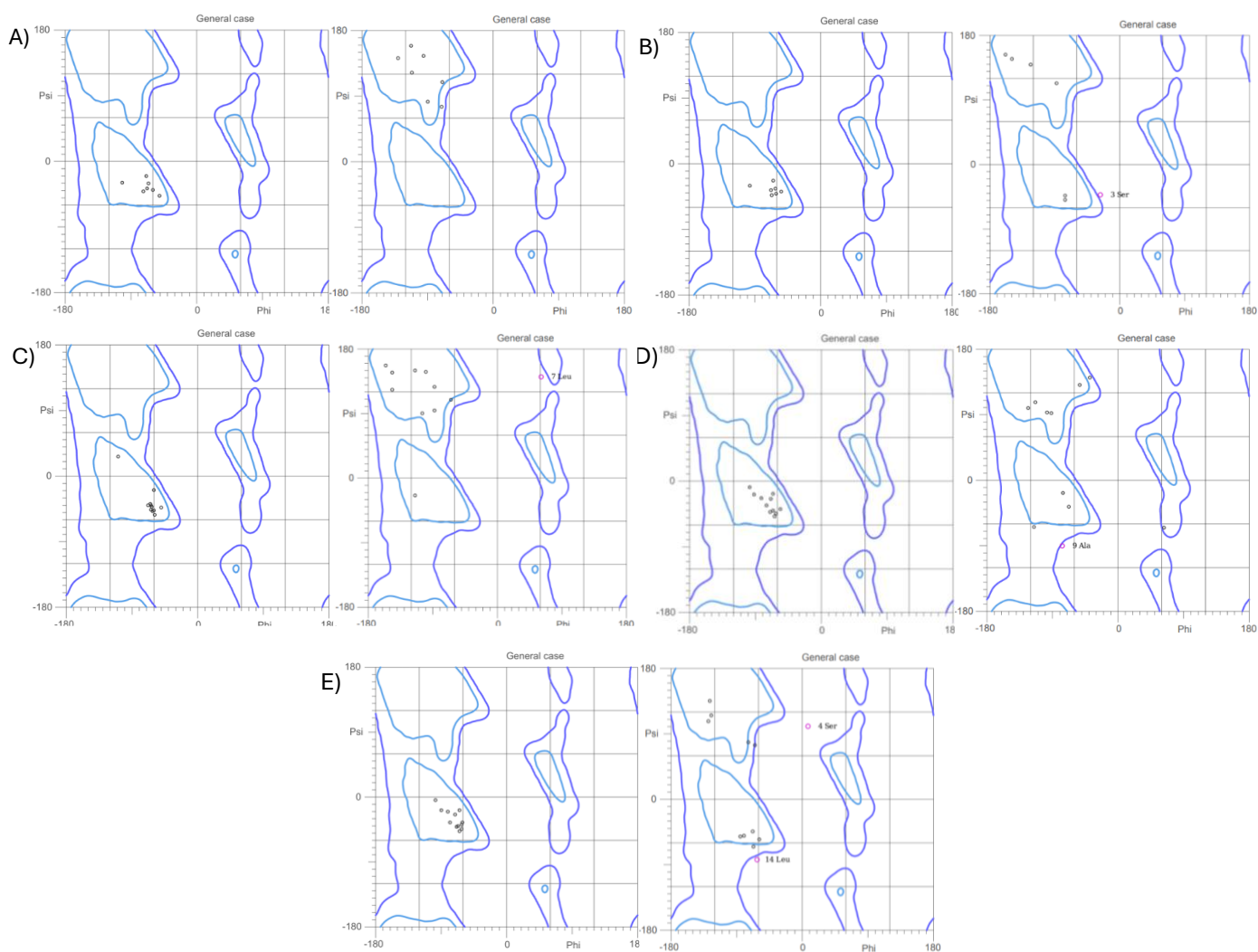


Figura 18. Diagramas de Ramachandran antes (izquierda) y después de 100 ns de simulación (derecha) de las simulaciones en fase acuosa para cada péptido A) Uy17, B) Uy192, C) Uy234, D) AcrAP1 y E) AcrAP2. Algunos péptidos cambiaron en parte de su estructura de una conformación de alfa hélice a beta, o simplemente sus residuos quedaron fuera de zonas permitidas.

8.11 Propuesta de sistema de interacción péptido/lípido

El PAM con mayor efecto antimicrobiano fue AcrAP1, el cual se utilizó para generar múltiples modelos en el servidor PEP-FOLD, este servidor emplea un algoritmo de tipo “simulated annealing” para explorar el espacio conformacional, como resultado se obtienen diversas estructuras del PAM entre las cuales se eligió la estructura más probable (Figura 65), a partir de esta estructura y del modelo de membrana bicapa POPC/POPG (50/50), la cual es típica de bacterias, se puede sugerir el mecanismo de acción péptido-membrana.

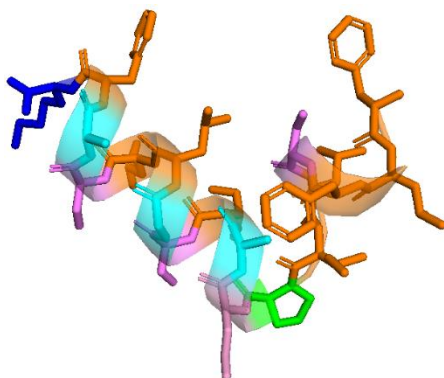


Figura 19. Predicción del PAM AcrAP1.

Las principales características de este péptido son:

- Residuos hidrofóbicos (favorecen la inserción en la membrana).
- Una distribución anfipática (combinación de residuos apolares y polares permite que el péptido forme una hélice anfipática).
- Residuo con carga positiva (K) al final de la estructura.

Los 5 residuos mas importantes en la interacción son los siguientes: F1, F3, P7, F17 y K18. Y se muestran en el modelo sugerido (Figura 66) para el mecanismo de acción del PAM AcrAP1 descrito paso a paso.

Paso 1. Atracción electrostática: el extremo C-terminal con K18 se acopla fuertemente a los lípidos POPG (la carga de la membrana favorece el anclaje).

Paso 2. Inserción de la hélice: el residuo P7 permite al peptido flexibilizarse y mientras el residuo K18 permanece anclado, la hélice anfipática penetra con una inclinación, estabilizada por residuos hidrófobos y aromáticos, entre los cuales están F1, F3.

Paso 3. Formación de poros: Múltiples copias del péptido se alinean y curvan la bicapa, formando un “poro toroidal”, donde los lípidos se doblan con los péptidos estabilizando el conducto.

Paso 4. Lisis celular: el poro permite la salida de iones y metabolitos lo cual desencadena en muerte celular por la alteración del equilibrio homeostático.

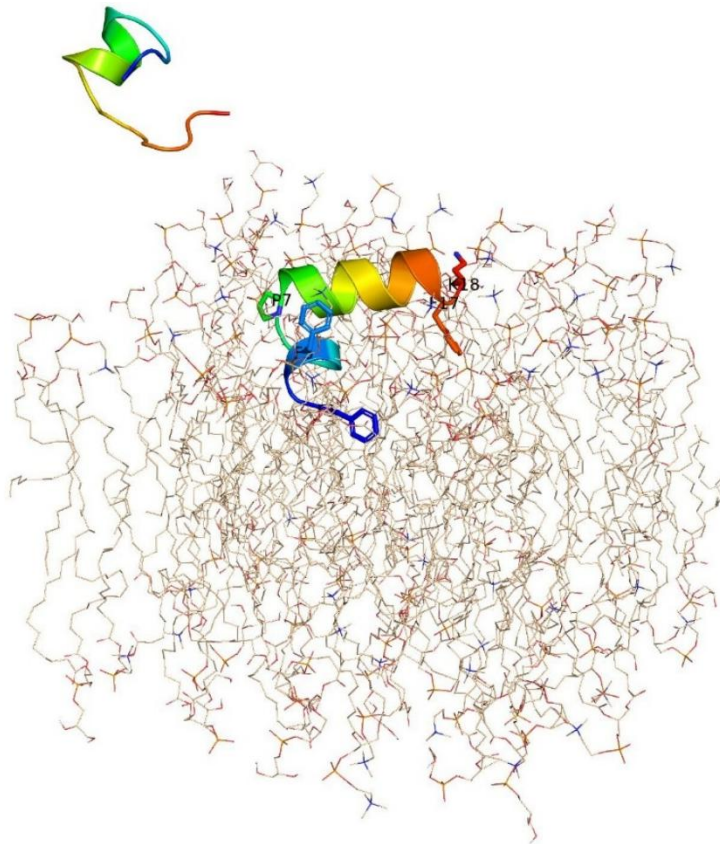


Figura 20. Mecanismo de interacción péptido-membrana propuesto.

La presencia de residuos altamente hidrofóbicos como fenilalanina (F), leucina (L) e isoleucina (I) en la región N-terminal promueve una inserción dentro del núcleo lipídico, lo que sugiere un anclaje estable en la membrana. La hélice se orienta de manera que sus residuos polares y cargados (como lisina en el extremo C-terminal) interactúan con las cabezas polares de los lípidos, especialmente con los fosfoglicerol (POPG), los cuales están cargados negativamente y son frecuentes en membranas bacterianas. El equilibrio POPC/POPG del 50% simula un entorno realista para membranas bacterianas, permitiendo estudiar la selectividad del péptido.

Es relevante destacar que la interacción del péptido no parece ser específica para una diana intracelular, lo cual refuerza la hipótesis de un mecanismo sobre la membrana no específico, dependiente de la composición lipídica. Esto explicaría la acción rápida y de amplio espectro observada en ensayos previos con péptidos estructuralmente similares. Y por último, la estructura parcialmente rígida del PAM y la conservación parcial de orden estructural (ya sea en α hélices ó β plegada) tras periodos de 100 ns de simulación en fase acuosa, refuerza la idea de que su mecanismo depende más de fuerzas físicas (electrostáticas e hidrofóbicas) que, de un reconocimiento específico molecular, como ocurre en otras clases de antimicrobianos.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo proporciona información valiosa ya que en él se analizan algunas de las principales propiedades fisicoquímicas y características estructurales de cinco PAM, desde la distribución de los residuos a lo largo de la cadena peptídica y hasta el análisis conformacional en simulaciones de dinámica molecular realizada con software de predicción para entender el comportamiento de estas estructuras en fase acuosa, con el fin de identificar los aspectos que pudieran resultar relevantes y que se les puede atribuir su actividad biológica.

Los datos analizados indican que las estigmurinas son más efectivas en menores concentraciones que las pantininas. Desde el punto de vista estructural es interesante ver como en este caso las estigmurinas son de mayor tamaño por la cantidad de residuos que las componen y que en la mayoría de los casos después del contacto con la fase acuosa puede formar nuevamente una estructura secundaria. Aunque los péptidos pertenecen a diferentes grupos de PAM, tienen ciertas similitudes en su estructura, por ejemplo, la conservación de los de residuos de serina e isoleucina en las mismas posiciones al momento de alinear las secuencias.

Desde el punto de vista fisicoquímico, estos PAM poseen una carga neta positiva, una hidrofobicidad alta y un cociente de bioactividad alto que contrasta con los datos de las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas sobre *S. aureus*. Las propiedades fisicoquímicas también condicionan la flexibilidad estructural de los PAM, permitiéndoles adaptarse a distintos microambientes (en este caso la fase acuosa) y desempeñar mecanismos de acción variados, lo que explica su amplio espectro antimicrobiano. Comprender las propiedades fisicoquímicas de los PAM permite proponer modificaciones para optimizar la eficacia antimicrobiana, reducir efectos como la hemólisis y mejorar la estabilidad en condiciones fisiológicas.

Los PAM mas activos fueron los pertenecientes a las estigmurinas, los cuales se caracterizaron por tener un potencial electrostatico (ϕ) alto en comparación a las pantininas, y un cociente de bioactividad mayor. Esto nos indica que el PAM al interactuar de mejor manera con la membrana lipídica, tendrá una mejor actividad antimicrobiana.

Se puede decir que el analisis *in silico* constituye una herramienta predictiva eficaz para seleccionar y analizar PAM, reduciendo el tiempo de investigacion y costos en el diseño o mejora de nuevos agentes terapeuticos.

Los resultados de este trabajo pueden ser la base de futuras investigaciones e iniciativas para la mejora o creación de nuevos agentes terapéuticos para combatir el problema de las infecciones por bacterias MDR. Sin embargo, se requiere una mayor recolección de datos experimentales sobre su actividad biológica para tener resultados más precisos que contribuyan a futuras aplicaciones clínicas.

10. REFERENCIAS

- 1) Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Taniguchi, T., Anzai, K., y Kirino, Y. (1991). Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *The Journal of biological chemistry*, 266(30), 20218–20222. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)54912-7/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)54912-7/pdf)
- 2) Ageitos, L., Torres, M. D. T., y de la Fuente-Nunez, C. (2022). Biologically Active Peptides from Venoms: Applications in Antibiotic Resistance, Cancer, and Beyond. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 15437. <https://doi.org/10.3390/ijms232315437>
- 3) Amorim, F., Cordeiro, F., Pinheiro, E., Boldrini, J. y Arantes, E. (2018). Microbial production of toxins from the scorpion venom: properties and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(15), 6319–6331. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9122-2>
- 4) Bahar, A. A., y Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- 5) Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
- 6) Cesa-Luna, C, Muñoz-Rojas J, Saab-Rincon G, Baez A, Morales-García YE, Juárez-González VR, y Quintero-Hernández V. (2019). Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *PLoS One*. 11;14(11): e0222438. doi: 10.1371/journal.pone.0222438. PMID: 31710627; PMCID: PMC6844485.
- 7) Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., y Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters*, 471(2-3), 165–168. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01384-3)
- 8) Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., y Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- 9) Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., & Nakajima, T. (2001). IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus*

- madagascariensis. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(4), 820–825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5472>
- 10) Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., y Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters*, 501(2-3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02648-5)
- 11) De la Fuente, N. M., Villarreal, J. M., Diaz, M.A., y Garcia, A P., (2015). Evaluation of the activity of antimicrobial agents against the challenge of bacterial resistance. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 46. 7-16.
- 12) De Lucca, A. J., y Walsh, T. J. (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.1.1>
- 13) Du Q, Hou X, Ge L, Li R, Zhou M, Wang H, Wang L, Wei M, Chen T, y Shaw C. (2014). Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, *Androctonus crassicauda*, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines. *Int J Biol Sci*. 21;10(10):1097-1107. <https://doi: 10.7150/ijbs.9859>.
- 14) Elufisan, T., Oyedara, O., Oyelade B. (2012) Updates on microbial resistance to drugs. *Afr. J. Microbiol.* (6) 4833–4844. [DOI: 10.5897/AJMR11.436](https://doi.org/10.5897/AJMR11.436)
- 15) Ferreira, S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 24(1), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x>
- 16) Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D. N., Rodnina, M. V., y Mankin, A. S. (2017). An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 24(9), 752–757. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3439>
- 17) Fong, P., Ramirez, V., Quintero, V., Balleza, D. (2024). A Critical Review of Short Antimicrobial Peptides from Scorpion Venoms, Their Physicochemical Attributes, and Potential for the Development of New Drugs. *J Membrane Biol* 257, 165–205. <https://doi.org/10.1007/s00232-024-00315-2>

- 18) Gagnon, M. G., Roy, R. N., Lomakin, I. B., Florin, T., Mankin, A. S., y Steitz, T. A. (2016). Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. *Nucleic acids research*, 44(5), 2439–2450. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw018>
- 19) Haiyang, Y. y Quiñones, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, (20). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2021000300020&lng=es&tlng=es.
- 20) Hancock, R. E., y Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- 21) Iltz, J. L., Baker, D. E., Setter, S. M., y Keith Campbell, R. (2006). Exenatide: an incretin mimetic for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical therapeutics*, 28(5), 652–665. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.05.006>
- 22) Jennings K., Austin A., Davies K., Harvey M., Hirst D., y Taylor G. (2009). Terrestrial Invertebrates. *Natural History of the Riverland and Murraylands*. 306-333. https://www.researchgate.net/publication/258212112_Terrestrial_Invertebrates
- 23) Jiménez-Castellanos, J. C., Pradel, E., Compagne, N., Vieira Da Cruz, A., Flipo, M., y Hartkoorn, R. C. (2023). Characterization of pyridylpiperazine-based efflux pump inhibitors for *Acinetobacter baumannii*. *JAC-antimicrobial resistance*, 5(5), dlad112. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad112>
- 24) Li, T., Liu, Q., Wang, D., y Li, J. (2019). Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish & shellfish immunology*, 92, 881–888. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.015>
- 25) Luo, Y., y Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
- 26) Migdalof, B. H., Antonaccio, M. J., McKinstry, D. N., Singhvi, S. M., Lan, S. J., Egli, P., y Kripalani, K. J. (1984). Captopril: pharmacology, metabolism and

- disposition. *Drug metabolism reviews*, 15(4), 841–869.
<https://doi.org/10.3109/03602538409041080>
- 27) Monod, L., Duperre, N. y Harms, D. (2019). An annotated catalogue of the scorpion types (Arachnida, Scorpiones) held in the Zoological Museum Hamburg. Part I: Parvorder Iurida Soleglad & Fet, 2003. *Evolutionary Systematics*. (3), 1-92.
[DOI:10.3897/evolsyst.3.37464](https://doi.org/10.3897/evolsyst.3.37464)
- 28) National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 44093, Captopril.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Captopril>.
- 29) National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Substance Record for SID 135610881, 141758-74-9, Source: ChEBI.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135610881>.
- 30) Nelson D., y Cox, M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman
- 31) Nomura, K., Corzo, G., Nakajima, T., y Iwashita, T. (2004). Orientation and pore-forming mechanism of a scorpion pore-forming peptide bound to magnetically oriented lipid bilayers. *Biophysical journal*, 87(4), 2497–2507.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.043513>
- 32) Pérez O. (2019). Scientific advances of scorpion venom. *ournal of the Selva Andina Research Society*, (10), 105-108. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2019.100200105>
- 33) Pérez, O., Espinoza, M., Vega, N. A. y Reyes E.A. (2019). Evaluación preliminar de actividad antibacteriana in vitro del veneno de escorpión *Hadruides charcasus* (Karsch, 1879) contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo* (12) 6-12.
[DOI:10.35434/rcmhnaaa.2019.121.477](https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2019.121.477)
- 34) Quintero, V., Cesa, C., y Muñoz, J. (2017) Péptidos antimicrobianos de alacrán. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
<https://hdl.handle.net/20.500.12371/9201>
- 35) Ramírez, M.G., Rodríguez, R. A., y Ávila, E. E. (2023) Péptidos antimicrobianos: moléculas pequeñas pero efectivas. *Avance y perspectiva*. (9)

<https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/peptidos-antimicrobianos-moleculas-pequenas-pero-efectivas/st>

- 36) Rayner, C., y Munckhof, W. J. (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal medicine journal*, 35 Suppl 2, S3–S16. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0903.2005.00976.x>
- 37) Rodríguez, A., Villegas, E., y Corzo, G. (2014) Venenos arácnidos: su sorprendente poder insecticida y su rara capacidad antibiótica. *Revista Digital Universitaria*. (15). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art85/index.html>
- 38) Rouhullah, D. y Behrooz, F. (2012). Scorpion sting in Iran: A review. *Toxicon*. (609), 919-933.
https://www.researchgate.net/publication/228101895_Scorpion_sting_in_Iran_A_review
- 39) Salazar-Hernández, D. (2023). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra aislados bacterianos de interés clínico. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19358>
- 40) Samael, A. K., Sánchez G., Carmona, I., Galicia, M. D. C., Gómez, A., Islas, S. J., y Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta medica de Mexico*, 154(6), 681–688. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>
- 41) Shah, P., Ali F., Noor-ul, H., Qayyum, S., Ahmed, S., Haleem, K., Tauseef, I., Mujaddad-ur, R., Hayat, A., Malik, A., Ramzan, R. y Khan I. (2018). Scorpion venom: A poison or a medicine-mini review. *Indian Journal of Geo Marine Science*. (47), 773-778.
https://www.researchgate.net/publication/305656242_Scorpion_Venom_A_Poison_or_a_Medicine-Mini_Review#fullTextFileContent
- 42) Stan, D., Enciu, A. M., Mateescu, A. L., Ion, A. C., Brezeanu, A. C., Stan, D., y Tanase, C. (2021). Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. *Frontiers in pharmacology*, 12, 723233. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.723233>

- 43) Svarch, A., Loera, M., Veloz, A., Salgado, H., Reyes, L., Camacho, R. (2024) Actions to Combat Antimicrobial Resistance in Mexico: A Perspective from COFEPRIS. *Revista Mexicana de Política Exterior*, (129) 73-86. <https://revistadigital.sre.gob.mx/index.php/rmpe/article/view/2680>
- 44) Téllez G. y Castaño J. (2010). Antimicrobial peptides. *Infect.* (14) 55-67 [https://doi.org/10.16/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.16/S0123-9392(10)70093-X)
- 45) Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European journal of biochemistry*, 267(16), 5023–5031. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>
- 46) Vélez, A., Mera, C., Orduz, S., y Branch, J. (2021) Synthetic antimicrobial peptides generation using recurrent neural networks. *DYNA* (88), 210-219 DOI: 10.15446/dyna.v88n216.88799
- 47) Verdonck, F., Bosteels, S., Desmet, J. Moerman, L., Noppe, W., Willems, J., Tytgat, J. y Walt, J. (2000). A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia*. 16. 247-260. https://www.researchgate.net/publication/285379509_A_novel_class_of_poreforming_peptides_in_the_venom_of_Parabuthus_schlechteri_Purcell_Scorpions_Buthidae
- 48) World Health Organization. (2010). Guidelines for the Treatment of Malaria, <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria>
- 49) World Health Organization. (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1
- 50) World Health Organization. Antimicrobial Resistance. (2023). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- 51) Zeng, X. C., Zhou, L., Shi, W., Luo, X., Zhang, L., Nie, Y., Wang, J., Wu, S., Cao, B., & Cao, H. (2013). Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides*, 45, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.026>

- 52) Zhou, G., Shi, Q. S., Huang, X. M., y Xie, X. B. (2015). The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 21711–21733. <https://doi.org/10.3390/ijms160921711>
- 53) Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in microbiology*, 10, 2866. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>
- 54) Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- 55) Amorim-Carmo, B., Parente, A. M. S., Souza, E. S., Silva-Junior, A. A., Araújo, R. M., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2022). Antimicrobial Peptide Analogs From Scorpions: Modifications and Structure-Activity. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 887763. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.887763>
- 56) Ahmed, T. A. E., & Hammami, R. (2019). Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of food biochemistry*, 43(1), e12546. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12546>
- 57) Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Dona, R., Oktarizal, R., & Nurfatimah, A. C. (2024). Exploring Substituted Tetrazoloquinazoline: Biological Activities, Molecular Docking Analysis, and Anti-Breast Cancer MCF7/HER2 Effects. *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences*, 2024, 6952142. <https://doi.org/10.1155/2024/6952142>
- 58) Jasim, Sarah & Najim, Mahdi. (2025). Electronic Structure of Proteins: Exciton Hamiltonian for a Dipeptide. *Journal of Wasit for Science and Medicine*. 18. 1-17. <https://doi.org/10.31185/jwsm.517>

11. ANEXOS

11.1 Búsqueda de las secuencias para cada péptido.

En la literatura ya se encuentran reportadas las secuencias de cada péptido, siendo descritas en diferentes artículos. Las estructuras y bioactividades de los péptidos para el veneno del alacrán *U. yaschenkoi* son mencionadas en el artículo de revisión “A Critical Review of Short Antimicrobial Peptides from Scorpion Venoms, Their Physicochemical Attributes, and Potential for the Development of New Drugs” (Fong-Coronado et al., 2024)., y para los péptidos del veneno del alacrán *Androctonus Crassicauda*, la información de su secuencia y bioactividades se encuentran en el artículo “Cationicity-Enhanced Analogues of the Antimicrobial Peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the Venom of the Scorpion, *Androctonus crassicauda*, Display Potent Growth Modulation Effects on Human Cancer Cell Lines” (Du et al., 2014).

11.2 Generación de modelos estructurales

En el navegador de internet buscar la herramienta <AlphaFold2> y abrir la página señalada en la siguiente imagen:

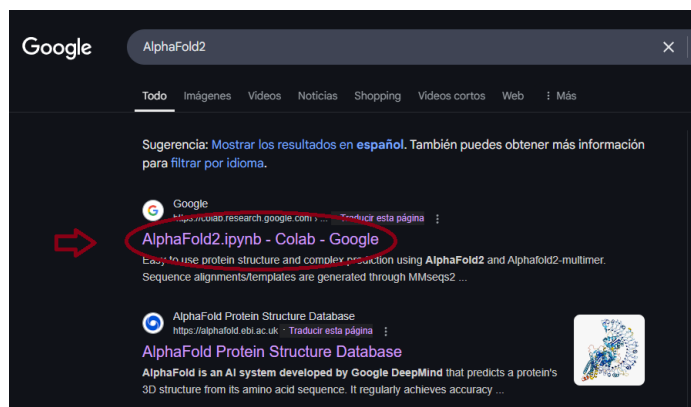


Figura 21. Servidor web “AlphaFold” usado para la predicción de estructuras de proteínas.

Dentro del sitio web en la sección [query_sequece] escribir la secuencia de aminoácidos del péptido que se desea generar, y en la sección [jobname] escribir el nombre del péptido, por último, dar clic en el botón señalado con la flecha, aparecerá un cuadro de texto de advertencia en el cual se debe seleccionar [ejecutar de todos modos] y esperar a que aparezca un [check] (marca de verificación de color verde) esto indica que el proceso puede continuar.

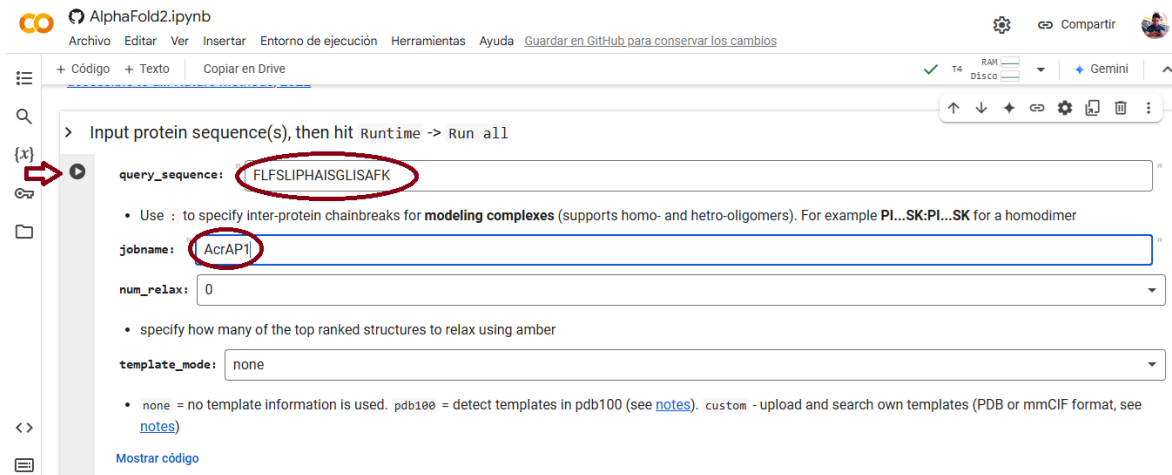


Figura 22. Interfaz inicial para la generación de estructuras del servidor “AlphaFold2”.

Después bajar en la página hasta encontrar la sección [install dependencies] y dar clic en el botón señalado, posteriormente esperar unos segundos mientras el sitio web instala el código y verificar la aparición del check verde al final de la instalación para poder continuar, después dar clic en el botón [MSA options] y esperar la verificación del [check] verde.

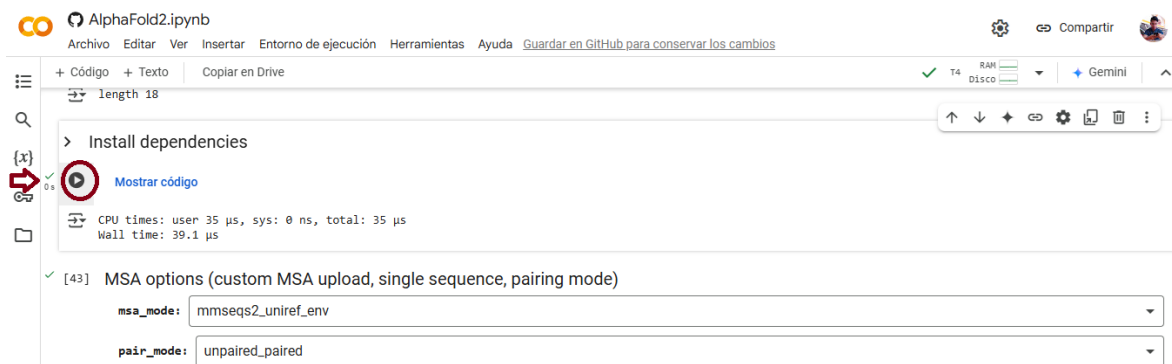


Figura 23. Interfaz para la carga de archivos al servidor “AlphaFold”.

El siguiente paso es bajar en la página a la sección [save settings] y en la opción [dpi] colocar el número 300, después dar clic en el botón [Run Prediction] y esperar unos segundos hasta la aparición del [check] verde para poder continuar.

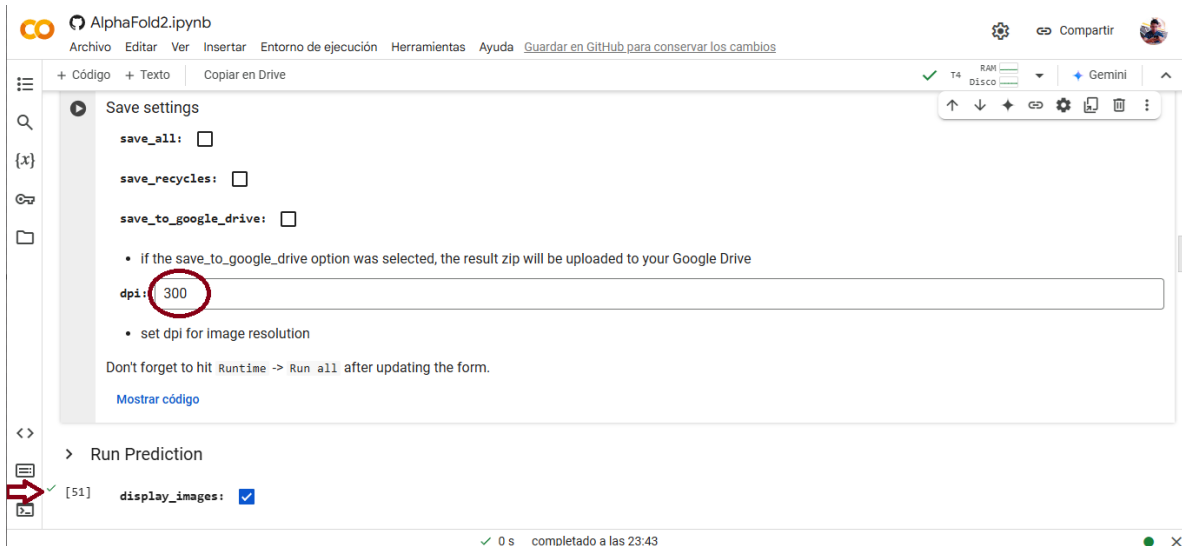


Figura 24. Ajustes para la resolución de la estructura generada.

Bajar en la página y dar clic en el botón de la sección [Display 3D structure], esperar a que termine el proceso y continuar hacia abajo.

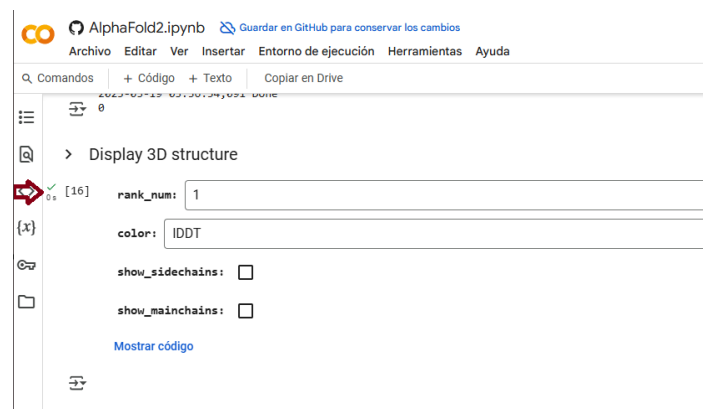


Figura 25. Interfaz de proceso para la generación de estructuras.

Dar clic en el botón de la sección [Plots] y esperar la verificación del [check] verde, posteriormente continuar en la siguiente sección.



Figura 26. Apartado de Plots para ejecutar la generación de estructuras.

Dirigirse a la sección [Package and download results] y hacer clic para descargar el archivo generado, este archivo está comprimido y debe ser descomprimido con ayuda de algún programa como <Win Rar®>, el archivo extraído del documento comprimido es de extensión [PDB].

11.3 Alineamiento de secuencias

Para este proceso es necesario tener acceso al programa <Bio Edit>, el cual deberá ejecutarse como administrador en el ordenador, una vez abierta la aplicación, hacer clic en la opción [File] y posteriormente seleccionar la opción [New Alignment].

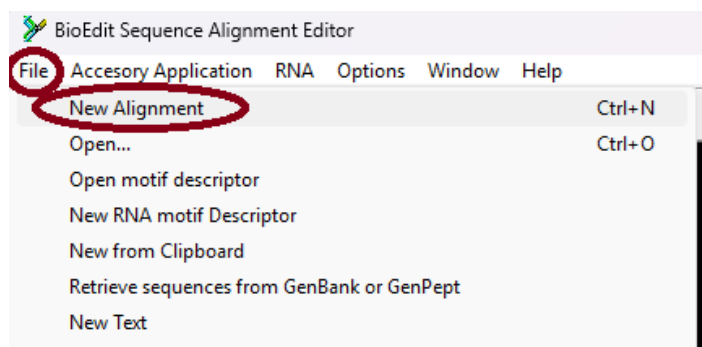


Figura 27. Ventana para realizar el alineamiento de secuencias en el programa “Bio Edit”

Para realizar el alineamiento es necesario hacer clic en la opción [sequence], se desplegará una ventana en la cual se debe seleccionar la opción [New sequence].

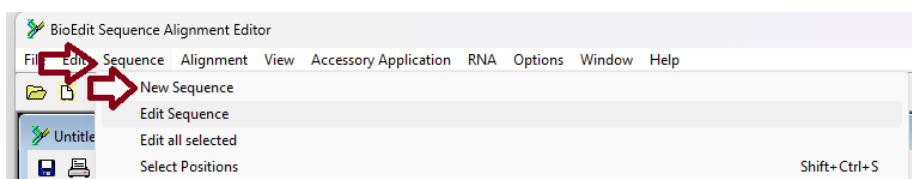


Figura 28. Ventana para la generación de un nuevo alineamiento de secuencias.

Posteriormente se abrirá una ventana en la cual se debe escribir el nombre de la estructura en el apartado [Name], seleccionar el tipo de secuencia en el apartado [sequence type], escribir la estructura de residuos de aminoácidos que conforman el péptido en el espacio blanco señalado como se muestra en la imagen y por último dar clic en el botón [Apply and close]. Repetir el proceso para cada secuencia de los 4 péptidos restantes.

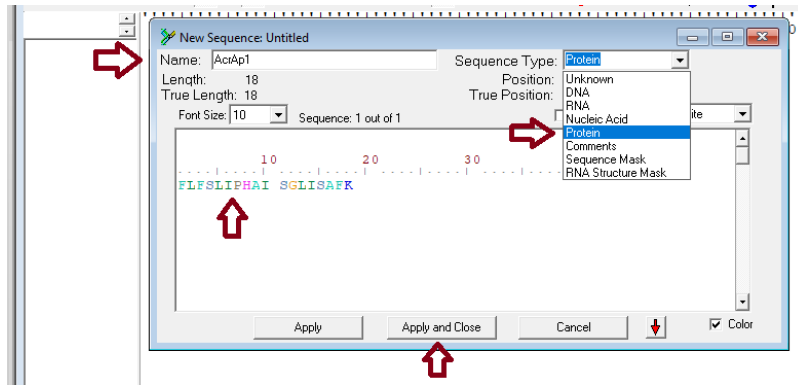


Figura 29. Ingreso de los datos de cada secuencia de los PAM.

Una vez agregadas las secuencias como se muestra en la imagen, seleccionar todas las secuencias y dar clic en la opción [Accessory Application], se desplegará una ventana, dar clic en la opción [ClustlaW Multiple alignment].

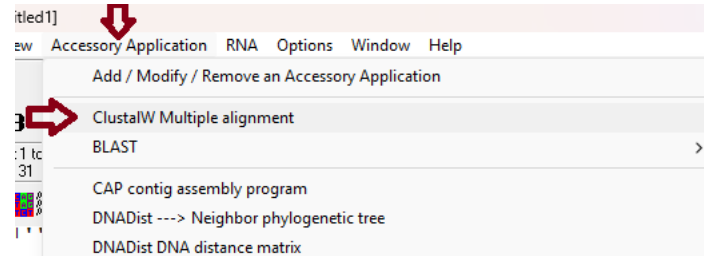


Figura 30. Selección de la opción para realizar el alineamiento múltiple de secuencias.

Una vez seleccionadas las secciones anteriores, aparecerá una ventana emergente en la cual se debe dar clic en la opción [Run ClustalW] para poder realizar el alineamiento de las secuencias.

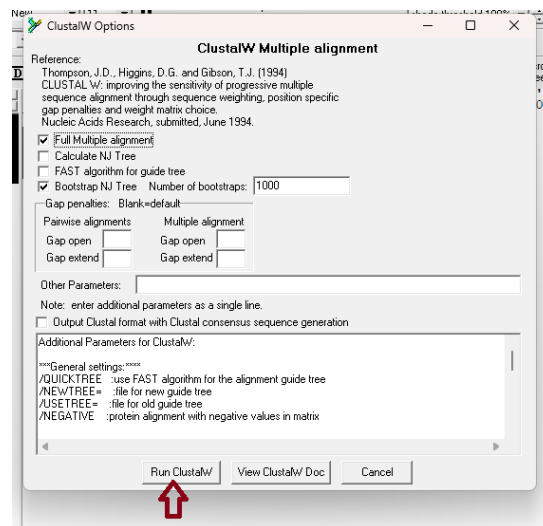


Figura 31. Ejecución del programa para el alineamiento múltiple de secuencias.

El alineamiento de secuencias será generado, seleccionar todas las secuencias nuevamente y dar clic en la opción [Shade identities and similarities in alignment window] para denotar que similitudes hay en estos péptidos respecto a la composición y ubicación de sus residuos de aminoácidos.

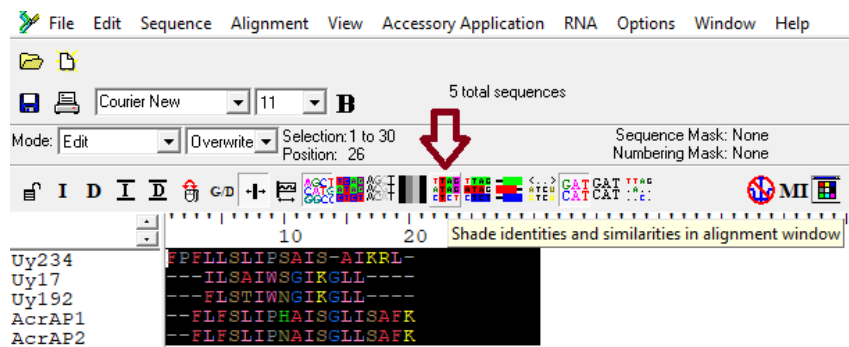


Figura 32. Identificación de similitudes para las secuencias alineadas.

11.4 Generación de logos de secuencias primarias

En el navegador, realizar la búsqueda de la página <WebLogo> y abrir la página señalada en la imagen.

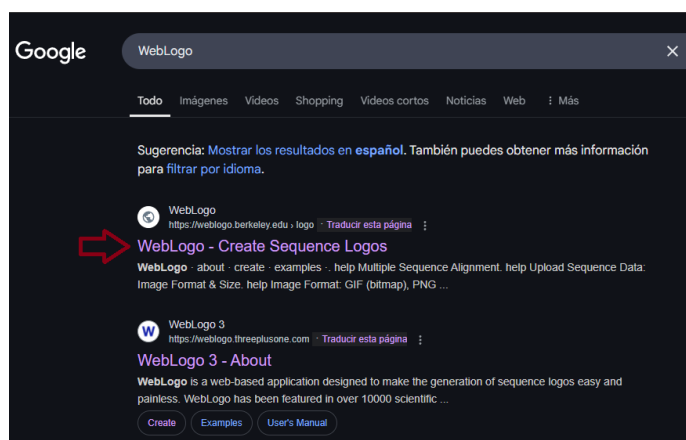


Figura 33. servidor web usado para la generación del logo.

Una vez dentro de la página, pegar en el recuadro de color blanco señalado, las secuencias de los péptidos previamente alineados, seleccionar un formato de salida en la opción [Image format] y seleccionar el tamaño del logo en la opción [Logo size per Line].

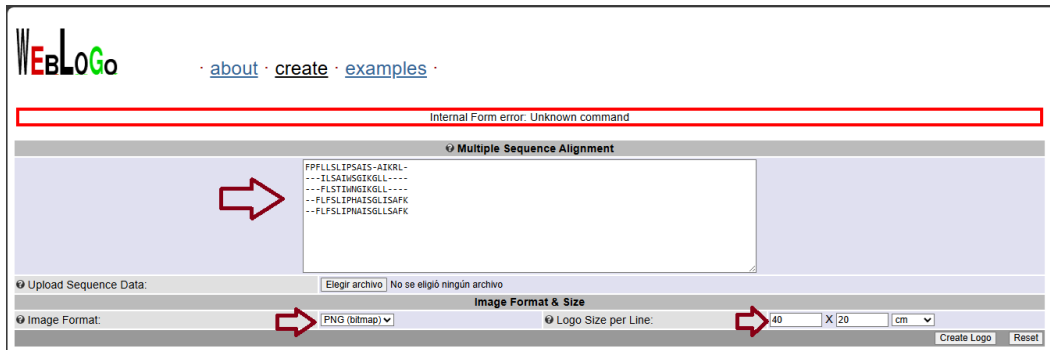


Figura 34. Interfaz del servidor “WebLogo” para el ingreso de secuencias múltiples previamente alineadas.

Posteriormente en la opción [Title] colocar el nombre que tendrá el logo generado, bajar hacia el apartado [Colors], seleccionar la opción [Custom] y en cada recuadro colocar la inicial de cada aminoácido para seleccionar un color de salida en la imagen del logo, esta opción es opcional y es de gran utilidad para visualizar de mejor manera los aminoácidos que componen estos 5 péptidos estudiados ya que se le puede dar un color específico a cada aminoácido y esto puede ser dependiente de su clasificación. Por último, dar clic en la opción [Create Logo] para poder descargar el logo y visualizarlo.

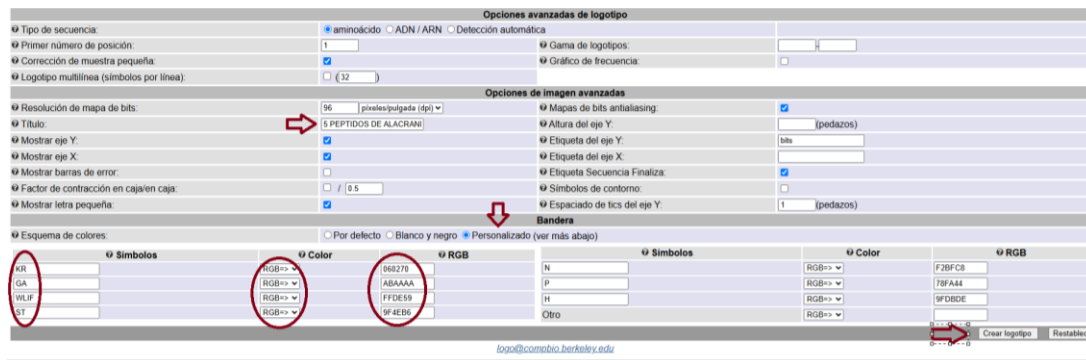


Figura 35. Opciones avanzadas para la generación del logo.

El logo generado es una herramienta grafica que permite visualizar y determinar que residuos pueden ser los de mayor importancia para que los péptidos tengan bioactividad sobre las membranas celulares, el logo generado para el alineamiento de los péptidos fue el siguiente:

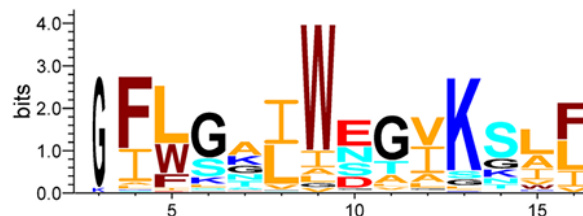


Figura 36. Ejemplo de logo generado para secuencias previamente alineadas de PAM del grupo de las pantininas (Fong-Coronado et al.,2024).

11.5 Validación de los modelos

Para la validación de los modelos generados, proceder a buscar en el navegador web la página <MolProbity>, abrir la página web señalada en la imagen

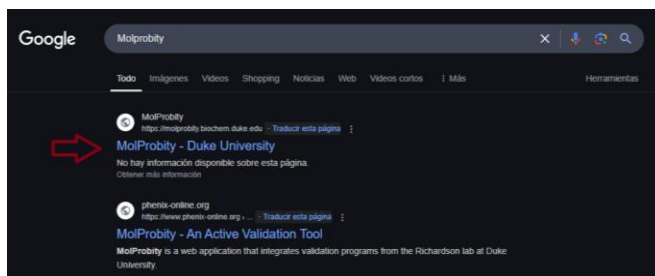


Figura 37. Servidor web “MolProbity” para la validación de estructuras.

Una vez abierta la página, dar clic en el botón [Seleccionar archivo], se desplegará una ventana en la cual se debe buscar la carpeta que contiene los archivos de los modelos generados con la herramienta <AlphaFold2>, seleccionar el modelo que se desea validar y en esa misma ventana dar clic sobre el botón [Abrir], una vez cargado el archivo en la página, la ventana se cerrará y se debe continuar dando clic en el botón [Upload].

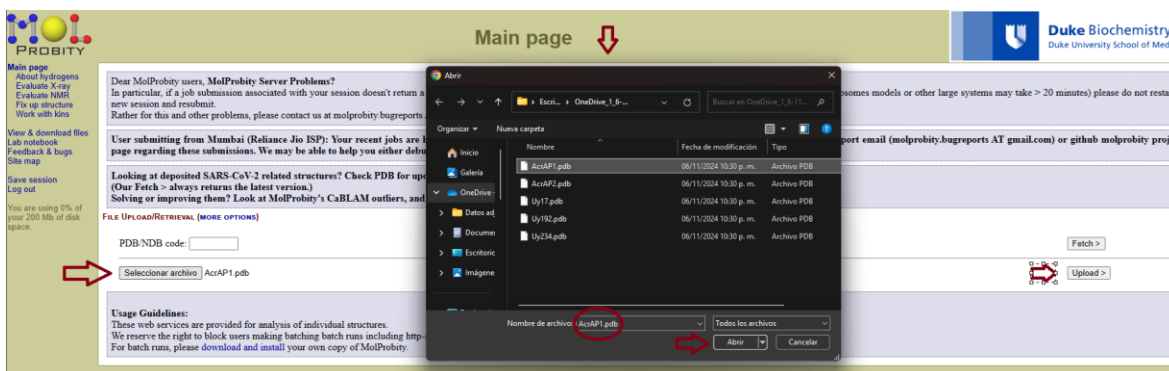


Figura 38. Página de inicio del servidor “MolProbity” para la carga de archivos de los modelos estructurales generados.

La herramienta <MolProbity> comenzará a ejecutarse, y una vez que termine, mostrará una ventana en la cual se confirma que el archivo se cargó de manera correcta, dará una breve lista de las características estructurales del péptido y mostrará una pequeña visualización del modelo estructural. Posteriormente dar clic en el botón [continue]

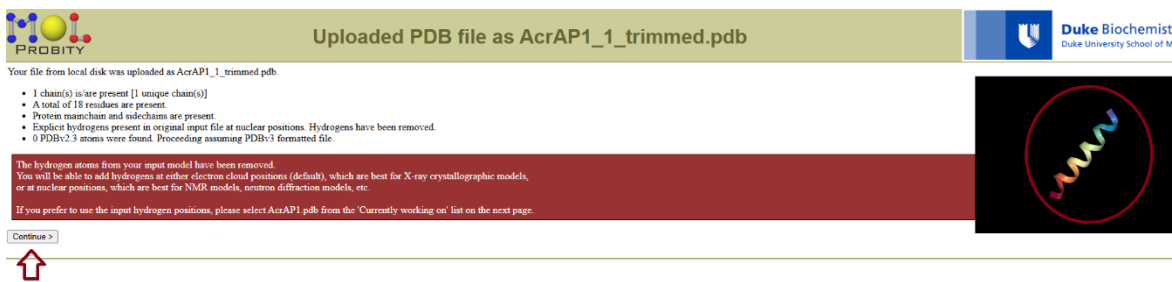


Figura 39. Proceso de validación para cada estructura de los PAM.

Lo siguiente es seleccionar la opción [Analyze geometry without all-atom contacts] y esperar a que cargue la información de este apartado.

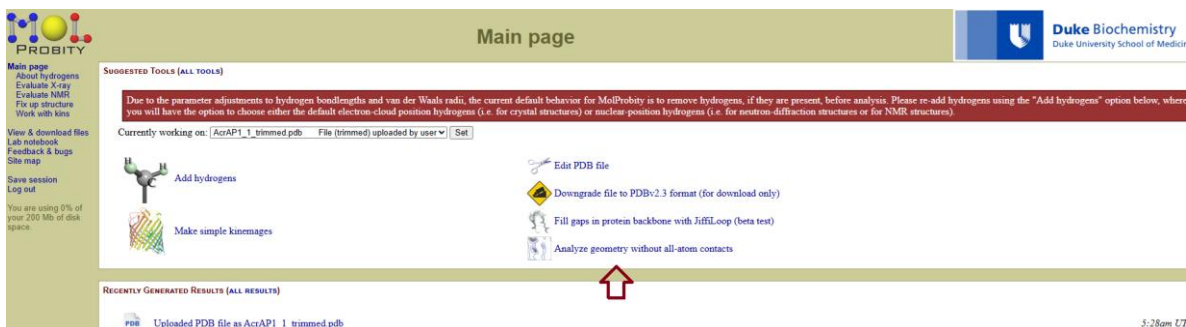


Figura 40. Herramientas del servidor “MolProbity” para el análisis de las estructuras generadas.

En la siguiente ventana desplazar hacia abajo y verificar que estén seleccionadas las opciones de [Ramachandran plots], dar clic en el botón [Run programs to perform these analyses] y esperar un par de minutos a que el programa termine de ejecutar.

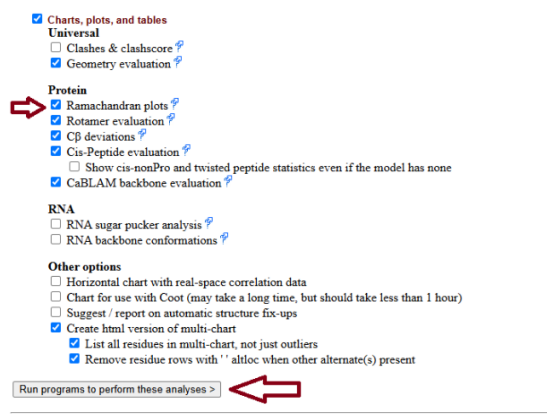


Figura 41. Generación de los diagramas de Ramachandran de las estructuras.

<MolProbity> creara un resumen estadístico en el cual se puede evaluar la geometría del modelo analizado, los resultados se expresan en porcentajes y se resaltan en color verde los parámetros favorecidos en el modelo estructural. Una vez analizados los parámetros estadísticos del recuadro, dar clic en el hipervínculo [view] de la opción [Ramachandran plot PDF] para poder visualizar los mapas de Ramachandran correspondientes.



Analysis output: geometry for AcrAP1_1_trimmed.pdb

Summary statistics

Category	Item	Count	Percentage	Goal	
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%	
	Favored rotamers	15	100.00%	Goal: >98%	
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%	
	Ramachandran favored	16	100.00%	Goal: >98%	
	Rama distribution Z-score	-1.43 ± 2.03		Goal: abs(Z score) < 2	
	C β deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0	
	Bad bonds	0 / 144	0.00%	Goal: 0%	
	Bad angles	0 / 194	0.00%	Goal: <0.1%	
	Peptide Omegas	Cis Prolines	0 / 1	0.00%	Expected: ≤ 1 per chain, or $\leq 5\%$
		CaBLAM outliers	0	0.0%	Goal: <1.0%
Low-resolution Criteria	CA Geometry outliers	0	0.00%	Goal: <0.5%	
	Chiral volume outliers	0/23			

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.
Key to table colors and cutoffs here: [?](#)

Multi-criterion visualizations



Multi-criterion kinemage

[View in KiNG](#) | [View in NGL](#) | [Download \(15 Kb\)](#)



Multi-criterion chart

[View \(24 Kb\)](#)

Single-criterion visualizations

- [Ramachandran plot kinemage \(405 Kb\)](#): [View in KiNG](#) | [View in NGL](#) | [Download](#)
- [Ramachandran plot PDF \(1.7 Mb\)](#): [View](#)
- [Ramachandran distribution Z-score analysis \(2.5 Kb\)](#): [View](#)
- [Chiral volume report \(786 bytes\)](#): [View](#)
- [C \$\beta\$ deviation scatter plot \(10 Kb\)](#): [View in KiNG](#) | [View in NGL](#) | [Download](#)

[Continue >](#)

Figura 42. Análisis estadístico de la geométrica de la estructura de cada PAM analizada y enlace para la visualización y descarga de los diagramas de Ramachandran.

Los mapas de Ramachandran se interpretan comprobando si los puntos (ángulos de torsión de los enlaces peptídicos) caen dentro de las regiones permitidas (zonas de rodeadas de color azul cielo), lo que indica conformaciones correctas de la estructura de la proteína, si los puntos que están en regiones no permitidas, lo que sugiere es que las características estructurales son inusuales.

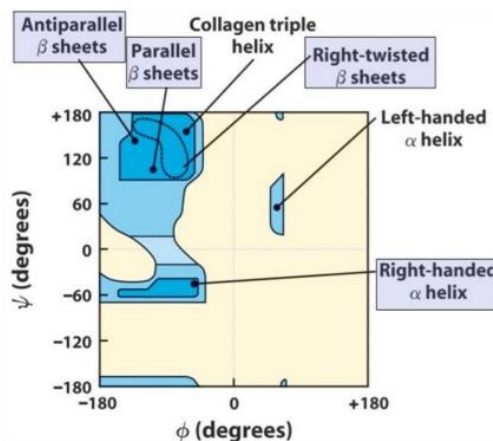


Figura 43. Ejemplo de diagrama de Ramachandran. En el diagrama se señalan las regiones permitidas de los ángulos de torsión de las estructuras. En el eje "X" se encuentran las coordenadas para los ángulos de los enlaces C-N y en el eje "Y" los ángulos de los enlaces C-C (Jasim, Sarah & Najim, Mahdi. 2025).

11.6 Cálculo de parámetros fisicoquímicos

Para algunos parámetros es necesario el uso del software en línea <Heliquest> esta herramienta permite realizar el cálculo de propiedades fisicoquímicas y la composición de aminoácidos de una secuencia de hélice, para ello es necesario ingresar al navegador web y

buscar la página <Heliquest>, a continuación, seleccionar la opción que se muestra en la imagen.

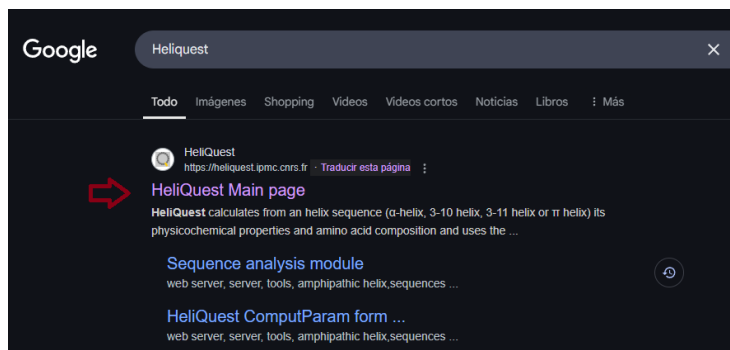


Figura 44. Servidor web “HeliQuest”.

Dentro de la página web, habrá una variedad de opciones entre las cuales permite realizar el análisis de secuencias y el módulo de cribado para secuencias de α -hélice y de 3-11 hélices, esto con el fin de analizar cualquier base de datos e identificar segmentos proteicos con características similares. Seleccionar la opción [Analysis] y el software redirigirá al siguiente paso.

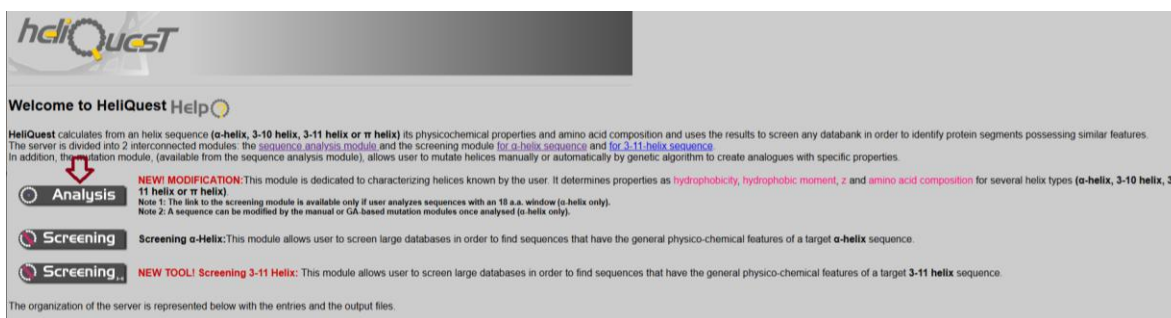


Figura 45. Interfaz de inicio del servidor Heliquest para el análisis y cribado de datos para secuencias alfa-helicoidales.

Escribir la secuencia a analizar, la secuencia debe escribirse con las iniciales de los aminoácidos que la componen en letra mayúscula como se muestra la imagen. Seleccionar las opciones que están encerradas en los círculos para que la imagen de salida tenga representados los aminoácidos en base a su tamaño molecular y también este alineado el vector respecto al momento hidrofóbico.

Figura 46. Ventana de ingreso de secuencia del PAM y opciones para el cálculo de propiedades fisicoquímicas.

<Heliquest> realizara el cálculo correspondiente para las siguientes propiedades fisicoquímicas: Hidrofobicidad, Momento hidrofóbico y carga neta. Además, proporciona más datos de utilidad, como lo es: la cantidad y porcentaje de residuos polares, no polares, con carga, sin carga, aromáticos y residuos especiales.

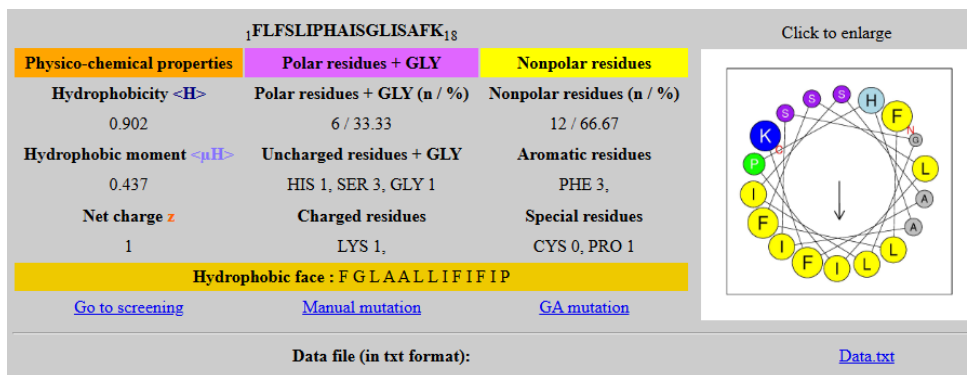


Figura 47. Resumen de algunas propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, momento hidrofóbico y carga neta) calculadas para los PAM y diagrama de rueda helicoidal generado.

11.7 Cálculo de la flexibilidad intrínseca

El cálculo se realiza con ayuda la herramienta <FlexiProt>, esta es una hoja de cálculo en la cual ya están definidas las fórmulas necesarias para realizar en automático el cálculo de la flexibilidad de péptidos a partir de su secuencia escrita por las letras de los aminoácidos que la componen.

Abrir la herramienta en el ordenador, al abrir se mostrará la hoja de cálculo como se observa en la imagen, desplazarse en el documento hacia la derecha hasta las columnas [Z-AK].

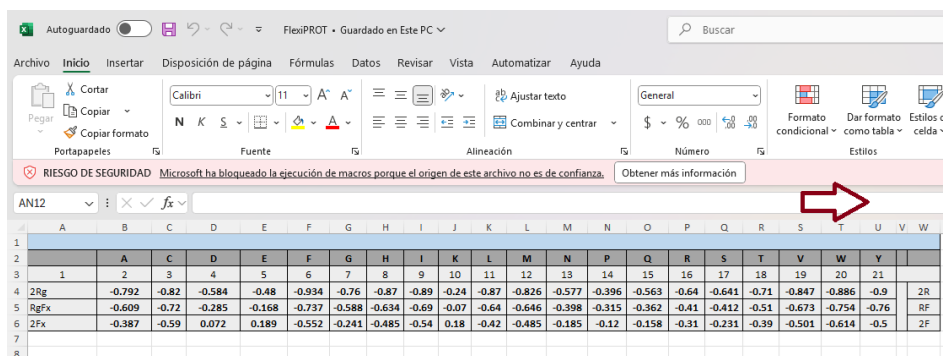


Figura 48. Herramienta FlexiProt. En la segunda fila se observan las iniciales de cada aminoácido y debajo de cada una se observan en cada columna los valores de radio de giro e índice de flexibilidad de cada residuo.

En esta sección de la hoja de cálculo se debe ingresar la secuencia de aminoácidos del péptido al que se calculara la flexibilidad, debajo de la celda [INPUT SEQUENCE], escribir la secuencia de aminoácidos del péptido colocando al inicio la letra [D] y al final la letra [P].

Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF
aa	Rg	Fx	INPUT SEQUENCE			Length
A	A Rg	D Fx	DILSAIWSGIKLLP			15
C	C Rg	E Fx				AminoAcid
D	F Rg	G Fx				R
E	H Rg	K Fx				Fx
F	I Rg	N Fx				
G	L Rg	P Fx				
H	M Rg	Q Fx	INPUT PDB			
I	V Rg	R Fx				
K	W Rg	S Fx				
L	Y Rg	T Fx	INPUT AF code			
M						
N						

Figura 49. Ingreso de la secuencia del PAM para el cálculo de la flexibilidad intrínseca.

Posteriormente seleccionar solo los datos numéricos en la columna [nB-factor], automáticamente se realiza el cálculo para el promedio de todos estos valores, el promedio se observa en la parte inferior derecha, a este valor se debe calcular el inverso [$1/\text{promedio}$], el valor resultante es la flexibilidad intrínseca para cada péptido.

Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK
aa	Rg	Fx	DFLFLIPNAISGLLSAFKP			Length	1	D	Fx		
A	A Rg	D Fx	DFPFLLSLIPSAISAIKRLP			20	2	F Rg	2Fx		-0.552
C	C Rg	E Fx					3	P Fx	2Rg		-0.396
D	F Rg	G Fx				AminoAcid	4	F Rg	RgFx		-0.737
E	H Rg	K Fx				R	5	L Rg	2Rg		-0.865
F	I Rg	N Fx				Fx	6	L Rg	RgFx		-0.642
G	L Rg	P Fx					7	S Fx	2Rg		-0.641
H	M Rg	Q Fx	INPUT PDB				8	L Rg	RgFx		-0.642
I	V Rg	R Fx					9	I Rg	RgFx		-0.693
K	W Rg	S Fx					10	P Fx	RgFx		-0.315
L	Y Rg	T Fx	INPUT AF code				11	S Fx	RgFx		-0.412
M							12	A Rg	RgFx		-0.609
N							13	I Rg	RgFx		-0.693
P							14	S Fx	2Rg		-0.641
Q							15	A Rg	RgFx		-0.609
R							16	I Rg	RgFx		-0.693
S							17	K Fx	RgFx		-0.065
T							18	R Fx	RgFx		-0.412
V							19	L Rg	2Fx		-0.422
W							20	P Fx	#N/D		#N/D
X									#N/D		#N/D
Y									#N/D		#N/D
Z									#N/D		#N/D

Figura 50. Cálculo del promedio del promedio para el parámetro “nB-factor2”.

11.8 Cálculo del momento dipolar

Abrir el navegador web y buscar <Protein Dipole Moment>, abrir la página web que se muestra en la imagen.

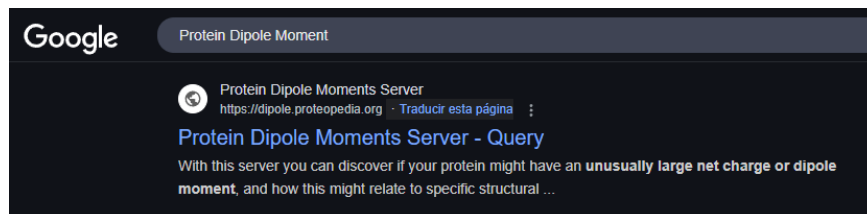


Figura 51. Servidor web “Protein Dipole Moment”.

Dentro de la página web, hacer clic en el botón [Seleccionar archivo], se desplegará una ventana en la cual se debe buscar la ubicación de los modelos creados con la herramienta <AlphaFold2>, seleccionar alguno de los modelos y hacer clic en el botón [Abrir] para cargar el archivo se cargará en el servidor web, posteriormente hacer clic en el botón [Submit].

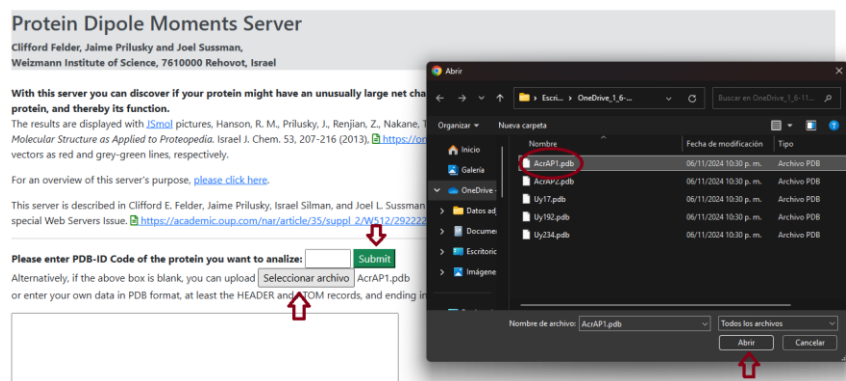


Figura 52. Interfaz de inicio del servidor “Protein Dipole Moment” para la carga de archivos en formato “pdb” de los modelos estructurales.

El servidor hará una tabla como en la siguiente imagen, en la cual estará resumida información como el momento dipolar o la carga neta.

Dipole moment for

	No. of Chains=1		Elongated		Neg.Res.	Charge	Dipole	Quadrapole	Crg./Nat.	Dip./Nat.
	No.Atoms	No.Res.	R _M	Pos.Res.						
Value	182.	18.	40.88	1.	-0.	1.	171.	48.	0.0055	0.9398
No.Dev.Units	-1.35	-1.39	-1.47	-1.41	-1.42	0.56	-0.89	-0.72	1.21	2.02

Dipole vector (in atomic units): 22.49 9.67 -25.86
 Mass Moments vector: 55.36 57.78 92.93
 Open a larger Jmol window.

Figura 53. Cálculo del momento dipolar y otras propiedades del PAM (número de átomos, cantidad de residuos, carga neta, etc.).

11.9 Cálculo del Índice de Boman

El índice de boman sirve para estimar el potencial de interacción de una proteína para unirse a membranas u otras proteínas como receptores, se calcula a partir de la secuencia de aminoácidos, el valor resultante es igual a la suma de los valores de solubilidad de cada residuo de la secuencia de aminoácidos y se divide entre el número total de residuos. Un valor bajo (<1.0) indica que la proteína tiene un perfil bajo de efectos secundarios y toxicidad.

En el navegador Web escribir <AMP database search> y acceder a la página web señalada.

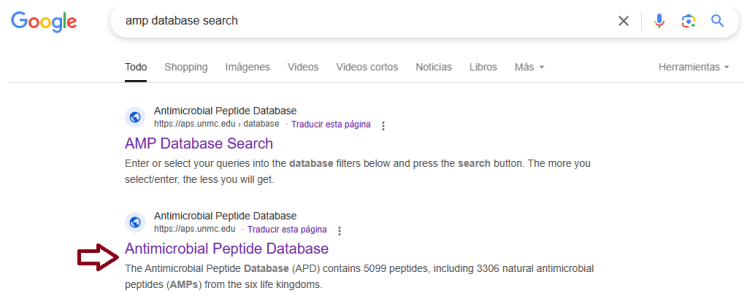


Figura 54. Servidor web “Antimicrobial Peptide Database”.

Dentro de la base de datos seleccionar la opción [Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor].

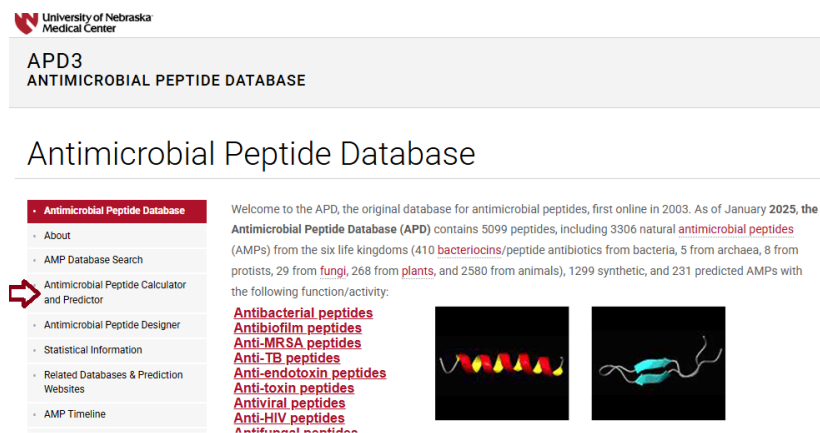


Figura 55. Inicio y herramientas del servidor “Antimicrobial Peptide Database”.

Ingresar la secuencia del péptido como se muestra en la imagen y hacer clic en el botón [Submit]. Algunos péptidos ya se encuentran en la base de datos, por lo cual su índice de boman ya ha sido calculado.

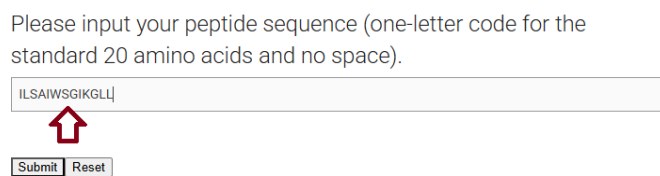


Figura 56. Ingreso de la secuencia de cada PAM para el cálculo del índice de Boman.

Hacer clic en el botón de color rojo y de inmediato la página redirigirá a la siguiente pestaña en donde se mostrarán los para metros calculados para el péptido seleccionado.

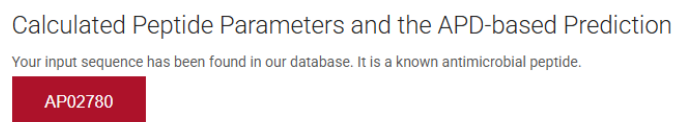


Figura 57. Página de redirección para visualizar los resultados de los parámetros calculados.

11.10 Simulaciones de dinámica molecular

Para realizar las simulaciones es necesario el uso de herramientas como WebGro (se debe realizar el registro con un correo institucional para su uso), una plataforma digital que utiliza el paquete de simulación [GROMACS] para realizar simulaciones de dinámica molecular. Solo es necesario cargar el archivo de proteína o péptido en este caso [con extensión .pdb] y WebGro realizará la simulación y el análisis de trayectorias. La página web de envío tiene valores predeterminados basados en trabajos publicados relacionados con simulaciones GROMACS.

Para ello se debe buscar la herramienta <WebGro> en el navegador Web y seleccionar la página que se muestra en la imagen.

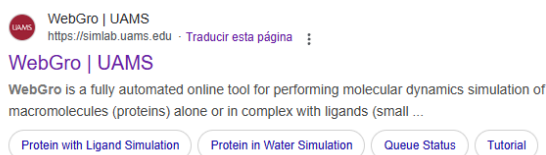


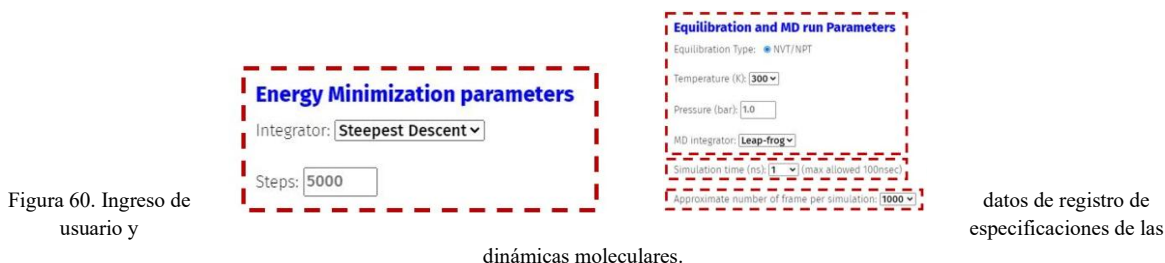
Figura 58. Servidor web de WebGro.

Dentro del simulador, cargar el documento pdb del péptido para realizar la simulación.



Figura 59. Ventana de carga para los archivos de formato “pdb” de cada estructura de los PAM.

Una vez cargado el archivo, se desplegará una ventana, en la cual ya tiene fijados algunos valores predeterminados para el análisis de dinámica molecular, además se debe ingresar el correo y contraseña que fueron usados en el registro en la plataforma.



Los parámetros para elegir en la simulación son: campo de fuerza, modelo de agua, caja de simulación, tipo de sal. Lo siguiente es seleccionar los parámetros de minimización

de energía, parámetros de equilibrio y ejecución de dinámica molecular (Temperatura, presión, tiempo en ns).

Input Parameters

EMAIL:

User key:

Register for user key [here](#)

Forcefield:

Water model:

Box Type:

Salt Type:

Neutralize add 0.15M salt **3**

Figura 61. Parámetros solicitados para la ejecución de la dinámica molecular de cada estructura.

Por último, seleccionar los análisis de resultados en la simulación y dar clic en el botón [Submit]

Simulation Result Analysis

- RMSD Computes Root Mean Square Deviation of the given structure over time
- RMSF Computes Root Mean Square Fluctuation of each residue in the given structure
- Rg Computes Radius of Gyration or structural compactness
- SASA Computes Solvent-Accessible Surface Area
- Hbonds Computes average number of H-bonds in each frame over time

Figura 62. Opciones de análisis de resultados de cada simulación.

11.11 Índice GRAVY (Grand Average of Hydrophobicity)

Es un valor que representa la hidrofobicidad promedio de una estructura proteica; se calcula a partir de los valores de hidropatía de todos los residuos de la secuencia y posteriormente se divide entre el número total de los residuos de la estructura. Un valor positivo creciente indica una mayor hidrofobicidad y un valor negativo sugiere una proteína hidrofílica.

Buscar en el navegador el servidor web ProtParam y acceder.

ExPASy
https://web.expasy.org/protpar... Traducir esta página

ProtParam

The computed parameters include the molecular weight, theoretical pi, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, ...

Figura 63. Servidor web “ProtParam” para el cálculo del índice GRAVY.

Ingresar la secuencia del PAM en el recuadro [Enter a protein sequence] posteriormente deslizar hacia abajo del servidor y dar clic en el botón [compute parameters].

Enter a protein sequence
Please enter one UniProtKB AC/ID (e.g. P05130 or KPC1_DROME).
Alternatively, enter one protein sequence in single letter code (e.g. ABCDEFGHIKLMNOPQRSTUVWXYZ).

Examples

FPFLLSLIPSAIAIKRI

Figura 64. Ingreso de la secuencia del PAM en el servidor ProtParam para el cálculo del índice GRAVY.

Se cargará una nueva ventana en la cual estará resumida cierta información de la cadena del PAM dirigirse al final de la página y ahí se encontrará el índice de inestabilidad, índice alifático y por último el índice GRAVY calculado.

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 53.34
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 162.78

Grand average of hydropathicity (GRAVY):1.328

Figura 65. Índice GRAVY calculado para el PAM Uy 234.