



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: **BIOQUIMICA Y GENETICA MICROBIANA**

Diseño racional *in silico* y caracterización de péptidos antimicrobianos, derivados del Uy234, contra bacterias multirresistentes a antibióticos convencionales.

PRESENTA:
QBC. Pedro Alejandro Fong Coronado

DIRECTORA DE TESIS:
D.C. Verónica Quintero Hernández

CO-DIRECTOR DE TESIS:
D.C. Daniel Balleza Mejía

PUEBLA, PUE

Junio 2025

DEDICATORIA

A mis padres, por haber estado conmigo en este proceso de altas y bajas. No existen suficientes palabras en este mundo para expresar lo agradecido que estoy de tenerlos como mis pilares.

A mi hermano, que con altas y bajas siempre ha estado conmigo.

A mi abuela Ramona, por ese amor tan intenso que me expresó durante todo este tiempo en Puebla. No hubiera podido sin ti.

A Dios, porque nunca me dejó solo, incluso cuando estuve falto de fe.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por otorgarme la beca para estudio de Posgrado (No. CVU 1278039) para llevar a cabo mis estudios en la Maestría en Ciencias (Microbiología).

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM)**, a la dirección del **Instituto de Ciencias (ICUAP)** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** por los apoyos otorgados.

Le agradezco profundamente a mi asesora de tesis, la **Dra. Verónica Quintero Hernández**. Muchas gracias por haberme impulsado en mi carrera y por apoyarme incondicionalmente en todo momento, incluso cuando las cosas tocaron fondo. Me enseñó cómo quiero ser cuando sea jefe; deja la vara muy alta. Siempre la recordaré con mucho cariño; sin duda, tiene un lugar en mi corazón.

A mi coasesor de tesis, el **Dr. Daniel Balleza Mejía**. Muchas gracias por su apoyo a lo largo de mis proyectos, por haberme recibido en su laboratorio y por la intensidad de su forma de trabajar. Lo recuerdo con mucha gratitud.

A mi hermana de otros padres, **Alin Vera**. Sabes que nada de esto hubiera sido posible sin ti. Gracias por darme tu hombro para acurrucarme cuando nada tenía sentido. Pusiste un ladrillo en mí, uno que forma parte de la pieza angular de esta torre en construcción.

A mi amigo, **Ángel López**. Tú sabes cuánto batallamos en Puebla, todas esas tardes sudando a gota gorda. Gracias por darme esa mano que me levantó y, hasta el último momento en que necesité ayuda, tú solo diste la otra para ser parte de otra historia.

A mi amiga, **Fernanda Díaz**. Gracias por ser esa compañera de aventuras que tanto necesitaba, por tu calidez y tu presencia cuando pisé el fango. Tu amistad es todo lo que una persona podría pedir.

A mis amigos, **Lucero Tovar y José Perez**. Que más podría decirles, los incondicionales en el peor de mis días. Dios los bendiga por y para siempre. Los llevo en mi corazón.

A mi mejor amigo, **Pablo Núñez**. Que después de años y años, de desesperarnos y gritarnos, de reírnos y compartir la vida, nunca abandonaste el barco. Gracias por estar.

A **Rossy, Pepe, Fer y a todos** los que formaron parte de esta aventura: me llevo una parte de ustedes en mi corazón.

ABREVIATURAS

° grados
°C Grados centígrados
 π pi
 μg microgramos
 μL microlitros
 μm micromolar
% porciento
aa Aminoácidos
AMPs *Antimicrobial peptides*
ATCC *American Type Culture Collection*
CL cardiolipina
CMB Concentración mínima bactericida
CFI Concentración mínima inhibitoria
dL Decilitro
D.O Densidad óptica
ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
g Gramos
kcal kilocaloría
LB Luria-Bertani
M Masa molar
MDR Multidrogo-resistente
ml Mililitros
nm nanómetros
NCTC *National Colletion of Type Cultures*
PE fosfatidiletanolamina
PG fosfatidilglicerol
RMN Resonancia Magnética Nuclear
rpm Repeticiones por minutos
UFC Unidades formadores de colonias
XDR Extradamente-resistente

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES DIRECTOS	17
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
DISEÑO RACIONAL DE VARIANTES DEL UY234	20
SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	23
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN <i>STOCK</i> DE AMPs	23
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE VARIANTES DEL UY234	23
ENSAYOS DE DIFUSIÓN RADIAL	24
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR MICRODILUCIÓN EN CALDO	24
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA	25
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS VARIANTES DEL UY234	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
DISEÑO DE VARIANTES PEPTÍDICAS DERIVADAS DE LA SECUENCIA DEL PÉPTIDO UY234	26
EL AUMENTO DE TAMAÑO INCREMENTÓ LA FLEXIBILIDAD EN LA MAYORÍA DE LAS VARIANTES	29
LA ADICIÓN DE TRIPTÓFANO ELEVÓ EL MOMENTO HIDRÓFOBICO Y LA RIGIDEZ DE LAS VARIANTES	33
EL ÁCIDO ASPÁRTICO AUMENTÓ EL MOMENTO DIPOLAR DE LAS VARIANTES	37
LA ELIMINACIÓN DE LA PROLINA CENTRAL SUPRIME LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	42
UY234-DR8 POSEE ACTIVIDAD ANTIMICROBINA CONTRA <i>A. BAUMANNII</i> AE12	45
LAS VARIANTES DE UY234 PRESENTAN BAJA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA	46
CONCLUSIONES	47
CONSIDERACIONES ÉTICAS	48
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Ejemplos de péptidos antimicrobianos.	12
2	Secuencias obtenidas del primer análisis combinatorio.	27
3	Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 2.	28
4	Secuencias obtenidas del segundo análisis combinatorio.	31
5	Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 4.	32
6	Secuencias obtenidas del tercer análisis combinatorio.	35
7	Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 6.	36
8	Secuencias obtenidas del cuarto análisis combinatorio.	39
9	Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 8.	40
10	Características fisicoquímicas de todas las variantes seleccionadas.	42
11	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del péptido Uy234 y sus variantes.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación de distintos mecanismos de resistencia antibacteriana.	10
2	Grupos de bacterias para las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos	11
3	Representación de una estructura membranal.	13
4	Fosfolípidos de membrana en <i>E. coli</i> con sus respectivos porcentajes dentro de la misma.	15
5	Modelos de acción de los AMPs.	16
6	Estrategias para el diseño de péptidos antimicrobianos (AMPs).	17
7	Alineamiento de la secuencia del péptido Uy234 con péptidos similares reportados en APD3.	30
8	Flexibilidad intrínseca de las variantes -IR	33
9	Representación de las interacciones del Triptófano con membranas modelo de lípidos zwitterionnicos.	34
10	Flexibilidad intrínseca contra momento hidrofóbico de las variantes -RT.	37
11	Flexibilidad intrínseca (mBf) contra momento hidrofóbico (mH) de las variantes -DR representadas con esferas de color y nombre.	41
12	Momento dipolar, m(D) de las variantes -DR.	42
13	Actividad antimicrobiana del péptido Uy234-R7.	44
14	Actividad bactericida de A) Uy234-R7; B) Uy234-RT8; C) Uy234-DR8 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	44
15	Actividad antimicrobiana del péptido Uy234-DR8 contra <i>A. baumannii</i> AE12, mediante el ensayo de difusión en agar.	45
16	Porcentaje hemólisis de eritrocitos humanos ejercido por el péptido Uy234 y sus variantes, a distintas concentraciones	46

RESUMEN

La resistencia a compuestos antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo para resistir o tolerar el efecto de estos. La MDR se define como la resistencia al menos a un agente de tres o más familias de antibióticos. Ante la aparición de MDR se ha instado al desarrollo de nuevos antibióticos con el fin de eliminar a los patógenos resistentes. En 2016, la OMS realizó un estudio para identificar bacterias resistentes a antibióticos para las cuales el desarrollo de nuevos antibióticos se considera prioritario. Los patógenos tales como *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, bacterias de la familia Enterobacteriaceae, resistentes a los beta-lactámicos, y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina se encuentran entre las más importantes. Se han propuesto alternativas contra bacterias MDR, como los AMPs. La mayoría de AMPs son oligopéptidos que van desde cinco a cien residuos aminoácidos, generalmente son catiónicos, anfipáticos, y además poseen estructuras α -helicoidales y/o β -laminares. Los alacranes se consideran una gran fuente de AMPs. El Uy234 es un péptido aislado de *Urodacus yaschenkoi*, presenta una α -hélice anfipática y una carga neta de +3. Presenta actividad antimicrobiana contra *Burkholderia cepacia*, *K. pneumoniae* *Streptococcus* sp. y *S. aureus*. El diseño racional *in silico* podría permitir obtener péptidos antimicrobianos derivados del Uy234 con una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las bacterias evaluadas en estudios anteriores. Dada las propiedades fisicoquímicas y estructurales del Uy234, el uso de herramientas bioinformáticas permitirá el diseño de variantes mejoradas. Se busca incrementar la rigidez del péptido para aumentar el grado de orden en su estructura tridimensional, lo que favorecería su interacción con la membrana y la creación de perturbaciones en la misma. Se sugiere que esto generará péptidos con una mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *A. baumannii*. Se realizaron bibliotecas *in silico* de 76 variantes del Uy234 mediante análisis combinatorios. La selección de variantes se llevó a cabo evaluando los parámetros fisicoquímicos más asociados con la actividad antimicrobiana. Se llevó a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana por ensayos cualitativos (Ensayos de Difusión Radial) y cuantitativos (CMI y CMB) de las variantes sintetizadas con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923 y *A. baumannii* AE12 (aislado clínico). La actividad hemolítica de las variantes del péptido se evaluó utilizando eritrocitos humanos. La adición de triptófano en el centro de la secuencia incrementó tanto el momento hidrofóbico como la rigidez de las variantes de Uy234, mientras que la incorporación de un residuo de ácido aspártico en el extremo C-terminal aumentó su momento dipolar. De las variantes sintetizadas químicamente, la variante Uy234-R7 mostró la mejor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* entre las cuatro variantes evaluadas. Uy234-A perdió su actividad citotóxica contra *S. aureus*. La variante Uy234-DR8 presentó actividad antimicrobiana en los ensayos de difusión directa en agar contra *A. baumannii* AE12. La actividad hemolítica no se incrementó de forma considerable en ninguna de las variantes del péptido Uy234.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a compuestos antimicrobianos (RAM), como los beta-lactámicos y aminoglucósidos, se define como la capacidad de un microorganismo para resistir o tolerar el efecto de estos. La RAM ocurre cuando un microorganismo evoluciona para poder sobrevivir bajo el efecto de un compuesto antimicrobiano (Chinemerem Nwobodo et al., 2022; De Oliveira et al., 2020). Dentro de los diversos tipos de resistencia antimicrobiana, la resistencia bacteriana se considera una de las principales amenazas para la salud humana (Giono-Cerezo et al., 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) pronostica que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos serán responsables de 10 millones de muertes por año para 2050 (Giono-Cerezo et al., 2020). Se estima que los países con ingresos medios y bajos serán los más afectados, albergando el 80% de las muertes (Sulis et al., 2022). La incidencia de la RAM se relaciona con el uso excesivo e inadecuado de compuestos tales como las cefalosporinas, tetraciclina o fluoroquinolonas, por lo que países con una alta prevalencia de enfermedades infecciosas presentan una mayor incidencia de esta clase de resistencia (Pulingam et al., 2022).

La RAM tiene importantes implicaciones económicas que repercuten en el incremento en los costos de atención a la salud (Porooshat, 2019). La elevación de costos es más prolongada en países de bajos ingresos debido a que los tratamientos suelen estar fuera del alcance de gran parte de la población. La mayoría de las consecuencias de la RAM recaen en estos países, y la aparición de microorganismos multidrogosresistentes y extremadamente resistentes ha agravado el problema (Pulingam et al., 2022). En hospitales mexicanos se observa una alta resistencia en carbapenémicos para *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* y *Acinetobacter* sp., así como alta prevalencia de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y estafilococos resistentes a la meticilina (SARM) (Garza-González et al., 2019).

La MDR se define como la resistencia al menos a un agente de tres o más familias de antibióticos y la XDR como la resistencia al menos a un agente en todas las familias de antibióticos excepto en dos o menos (Magiorakos et al., 2012). La aparición de bacterias MDR o XDR implica la presencia de múltiples mecanismos de resistencia. Estos mecanismos abarcan desde activación de bombas de flujo localizadas en la membrana citoplasmática, responsables de expulsar compuestos tóxicos fuera de la célula; alteración del sitio blanco de ya sea por mutaciones o modificaciones enzimáticas; así como la producción de enzimas capaces de inactivar o degradar el fármaco (Figura 1) (Christaki et al., 2020; Pulingam et al., 2022)

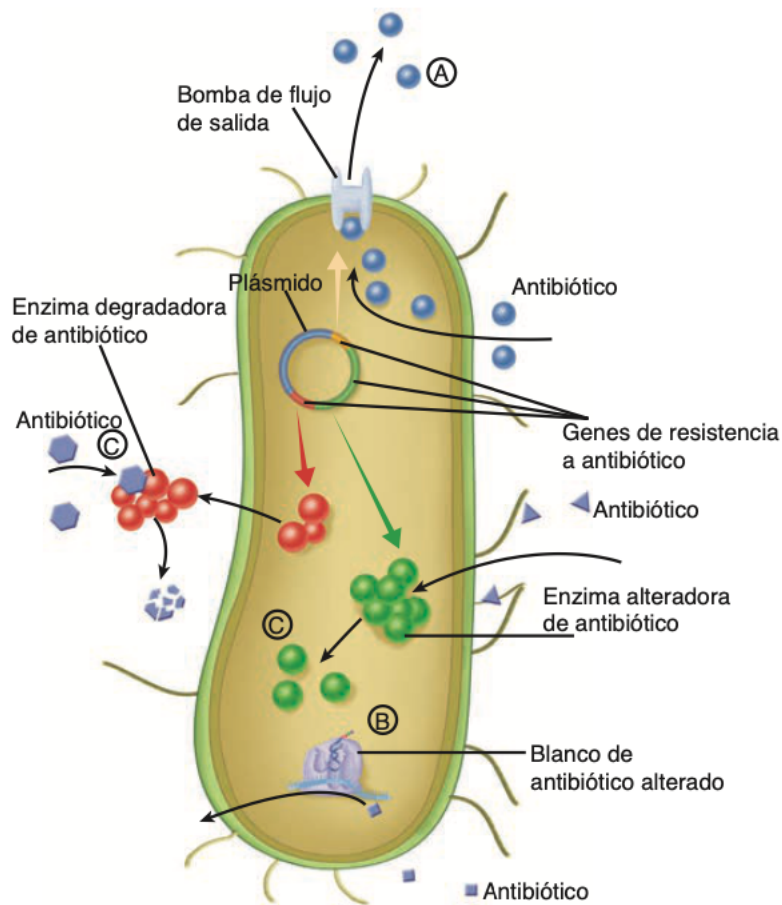


Figura 1. Representación de distintos mecanismos de resistencia antibacteriana (Figura tomada de Ryan, 2018)

Ante la aparición de MDR se ha instado al desarrollo de nuevos antibióticos con el fin de eliminar a los patógenos resistentes (Karaiskos et al., 2019). En 2016, la OMS realizó un estudio para identificar bacterias resistentes a antibióticos para las cuales el desarrollo de nuevos antibióticos se considera prioritario y se llegó a la conclusión de que patógenos tales como *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, bacterias de la familia Enterobacteriaceae, resistentes a los beta-lactámicos, y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina se encuentran entre las más importantes (Tacconelli et al., 2018). Estas bacterias patógenas se clasifican en tres categorías (Figura 2), según la urgencia en la que se requiere su control: (1) prioridad crítica, (2) alta o (3) media. En el primer grupo se encuentran las Enterobacteriaceae, así como las especies *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa* (Quintero, 2021).

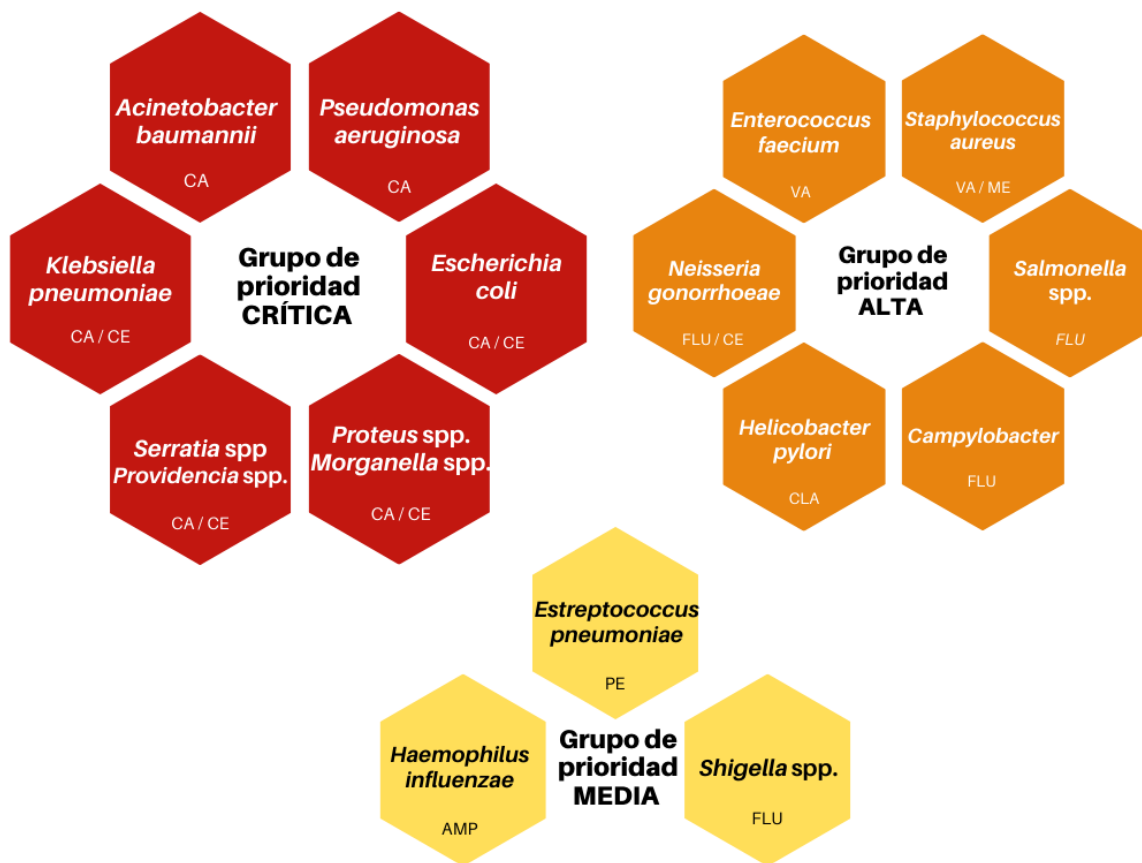


Figura 2. Grupos de bacterias para las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos. Se clasifican en tres categorías, según la urgencia en la que se requieren: prioridad crítica, alta o media. CA= resistente a carbapenémicos (antibióticos de amplio espectro), CE= resistente a cefalosporinas de 3ra generación, VA= resistente a vancomicina, ME= resistente a meticilina, CLA= resistente a claritromicina, FLU= resistente a fluoroquinolona, PE= resistente a penicilina, AMP= resistente a ampicilina (Figura tomada de Quintero, 2021).

Con el aumento en la RAM, paradójicamente, el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido (Harrison et al., 2014). Las compañías farmacéuticas han abandonado la búsqueda de nuevos medicamentos debido a los altos costos en su desarrollo, los ambiguos requisitos para su aprobación y la baja rentabilidad económica para su implementación. Resultado de esto, la responsabilidad para el desarrollo de nuevos antibióticos ha recaído en la investigación científica (Chinemerem Nwobodo et al., 2022).

El desarrollo de nuevos antibióticos implica la búsqueda de aquellos compuestos con características mejoradas. Tales características incluyen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento del patógeno sin generar disbiosis (alteración en la composición de la microbiota) que tengan una baja probabilidad de generar resistencia y que a su vez tenga una baja toxicidad en el huésped. El último punto podría considerarse altamente importante,

debido a que la mayoría de los compuestos pueden ser tóxicos a dosis elevadas (Singh et al., 2017).

Bajo esta óptica, se han propuesto alternativas contra bacterias MDR, algunas de las cuales ya se han puesto en marcha. El uso de AMPs contra infecciones por bacterias MDR ha sido uno de los principales objetivos en esta clase de estudios (Chakraborty et al., 2022). La mayoría de AMPs son oligopéptidos que van desde cinco a cien residuos aminoacídicos, generalmente son catiónicos, anfipáticos, y además poseen estructuras α -helicoidales y/o β -laminares (Bin Hafeez et al., 2021; Ibarra-Valencia et al., 2021). Estas propiedades son fundamentales para su mecanismo de acción, centrado en la interacción y disrupción de la membrana bacteriana, como se detalla en los párrafos subsecuentes.

Los AMPs se encuentran presentes en todos los Phyla del árbol de la vida (Tabla 1). Dentro del grupo de los artrópodos, los alacranes, y particularmente su veneno, puede considerarse una gran fuente de AMPs debido a su alta biodiversidad (Al-Asmari et al., 2017). El veneno de alacrán es producido en las glándulas ubicadas en el telson y está compuesto por una mezcla compleja de sales, enzimas y péptidos, que estos utilizan para defenderse y capturar a sus presas. Entre los péptidos antimicrobianos de veneno de alacrán destaca la escorpina, aislada de *Pandinus imperator*, considerada uno de los primeros AMP de alacrán descubiertos (Conde et al., 2000; Luna-Ramírez et al., 2013).

Tabla 1. Ejemplos de péptidos antimicrobianos

Reino	Nombre de péptido	Fuente biológica	Grupo diana	Estructura diana
Archae	Lantipéptido Archalan α	<i>Halorussus</i> sp. XZYJT40	Bacterias, arqueas	Membrana lipídica
Bacteria	Actagardina	<i>Actinoplanes garbadinensis</i>	Bacterias	Lípido II
Fungi	Ganodermina	<i>Ganoderma lucidum</i>	Bacterias, Animales	Membrana lipídica
Plantae	Galaxamida	<i>Galaxaura filamentosa</i>	Animales	Membrana mitocondrial
Protista	Acantaporina	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Bacterias, Animales	Membrana lipídica
Virus	PepG1	Bacteriófago de <i>Staphylococcus</i>	Bacterias, Animales	Membrana lipídica
Animalia	Kahalalide A	<i>Elysia rufescens</i>	Animales (Gram +)	Membrana lipídica, ácidos nucleicos

Varios AMPs de alacrán son péptidos pequeños (10–25 residuos), generados a partir de la modificación postraduccional de un precursor compuesto por un péptido señal, un péptido maduro, un motivo GKR o GRR (sitio de reconocimiento para el corte enzimático) y un propéptido (Fong-Coronado et al., 2024). Su reducido tamaño los hace atractivos para su uso, ya que permite una síntesis química más económica. Paralelamente, los péptidos pequeños pueden insertarse de forma más eficiente en la membrana plasmática, en comparación con péptidos más grandes. Otra característica importante es su amidación en el extremo C-terminal, la cual los protege de la degradación por proteasas y le brinda estabilidad a la hélice- α (Amorim-Carmo et al., 2022).

Dado que el blanco de acción para esta clase de AMPs es la membrana celular, cuyo principal componente es una bicapa lipídica, es prioritario conocer a detalle sus principales características y propiedades para optimizar la acción antimicrobiana de estos péptidos. La región central de la bicapa se caracteriza por ser una gruesa capa hidrofóbica que evita que las moléculas polares la atraviesen. Los lípidos no se distribuyen de manera uniforme en la membrana; por el contrario, distintas especies lipídicas tienden a agruparse en dominios, lo que contribuye a su carácter de mosaico asimétrico. Además, la membrana contiene proteínas y carbohidratos insertados, lo que le confiere una gran diversidad estructural y funcional (Figura 3) (Lingwood & Simons, 2010).

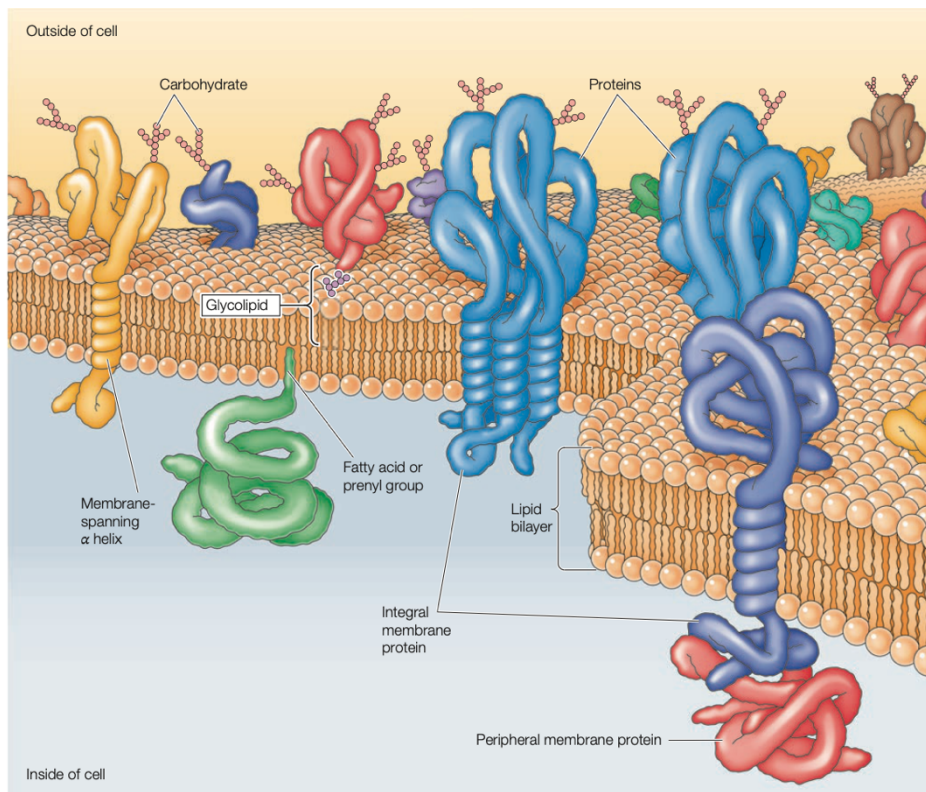


Figura 3. Representación de una estructura membranal (Figura tomada de Cooper, 2019)

Los principales componentes de las membranas celulares son glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. En el caso de los glicerofosfolípidos, estos se clasifican según el grupo sustituyente en la cabeza polar, el cual, junto con el grupo fosfato, se encuentra expuesto al medio acuoso. En bacterias, la composición lipídica incluye lípidos aniónicos como el fosfatidilglicerol y la cardiolipina, lípidos zwitteriónicos como la fosfatidiletanolamina, y en menor proporción fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, así como lípidos basados en la ornitina (Sohlenkamp & Geiger, 2015). La composición lipídica varía según la especie y las condiciones ambientales. Por ejemplo, la Figura 4 muestra una estimación de dicha composición en *E. coli*. En *S. aureus*, la membrana está compuesta principalmente de fosfatidilglicerol y cardiolipina, mientras que en *A. baumannii* mayormente se componen de lípido A, PE, PG y CL (Carey et al., 2022; J. H. Jiang et al., 2019; X. Jiang et al., 2020; Koprivnjak et al., 2011). Conocer la composición lipídica de las membranas bacterianas es importante para el diseño de péptidos-membrana específicos (Kabelka & Vácha, 2021).

Aunque el mecanismo de acción de los AMPs no está aún del todo esclarecido, se sabe que interactúan con la membrana para poder ejercer su acción lítica. Esta interacción se produce a través de interacciones electrostáticas entre el péptido y la membrana. Tomando como ejemplo lo que se ha descubierto en bacterias, se sabe que la región con carga catiónica de estos péptidos interactúa con la parte polar de los fosfolípidos del lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas y con los ácidos teicoicos en las Gram-positivas a través del grupo fosfato, que posee carga negativa (Brogden, 2005). Así, la interacción de estos péptidos en función de la composición lipídica resulta en una alteración en la homeostasis celular y posteriormente la muerte celular. Por esta razón, el desarrollo de resistencia bacteriana ante esta clase de péptidos que actúan a nivel de la membrana es difícil por ser de carácter inespecífica y genérica (Kabelka & Vácha, 2021).

Los péptidos que actúan en la membrana celular presentan distintos mecanismos de acción: (a) ruptura de la membrana celular y adelgazamiento de esta; (b) formación de poros; (c) solubilización de la membrana, efecto detergente o modelo de alfombra; (d) formación de micelas invertidas (Kabelka & Vácha, 2021). A continuación, se mencionarán tres modelos de acción de AMPs de los cuáles se tiene más información. La formación de poros en la membrana requiere altas concentraciones de AMPs pero menos que el modelo de alfombra (REF). Existen dos modelos estructurales de poros bien establecidos: modelo de barril y modelo toroidal. En el modelo de barril, los AMPs, generalmente muy hidrofóbicos, se agrupan estrechamente formando un conjunto que rodea al lumen del poro; los péptidos se orientan de manera perpendicular al plano membranal los grupos polares de los lípidos no están involucrados en la estructura del poro. En cambio, en el modelo toroidal las cabezas lipídicas participan en la formación del poro y los péptidos, generalmente muy flexibles, se encuentran dispersos alrededor de la estructura (Figura 5)(Kabelka & Vácha, 2021). En el

modelo de alfombra, los AMPs, generalmente muy cortos e incapaces de atravesar íntegramente el grosor de la bicapa lipídica, se agrupan alrededor de la membrana, cubriéndola de forma similar a como lo haría una alfombra en el suelo. A concentraciones elevadas, los péptidos se orientan hacia la membrana y la desestabilizan, formando micelas, similar al efecto de un detergente () (Broden, 2005). Existe evidencia experimental que sugiere que los péptidos antimicrobianos de menor longitud, como la estigmurina (17 aminoácidos) y la Ctriporina (19 aminoácidos), tienden a favorecer la formación de micelas. En cambio, péptidos más largos, como la Pandinina 2 (24 aa), se asocian con la formación de poros acuosos en la membrana (Fong-Coronado et al., 2024).

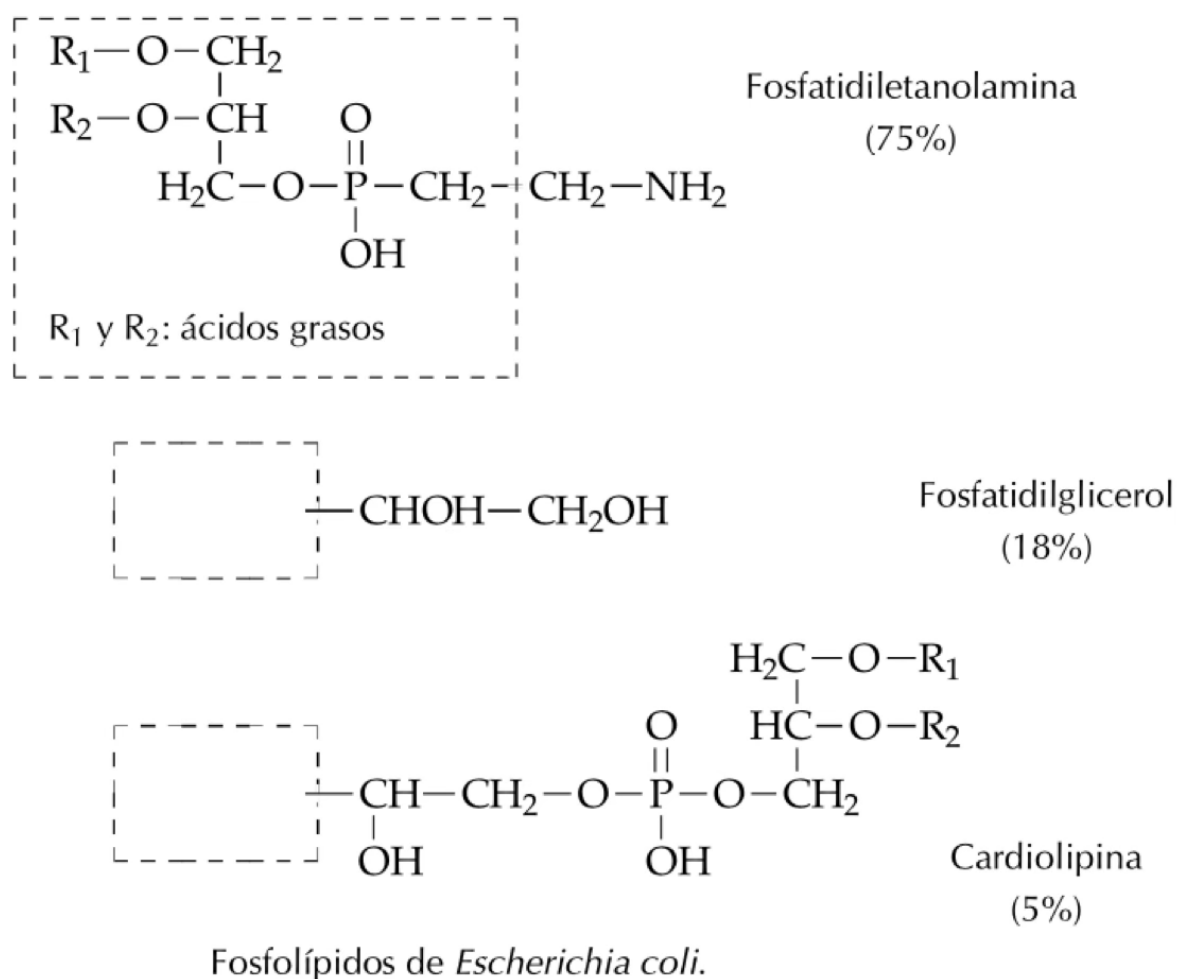


Figura 4. Fosfolípidos de membrana en *E. coli* con sus respectivos porcentajes dentro de la misma (Figura tomada de Parés I Farràs & Juárez Giménez, 1997).

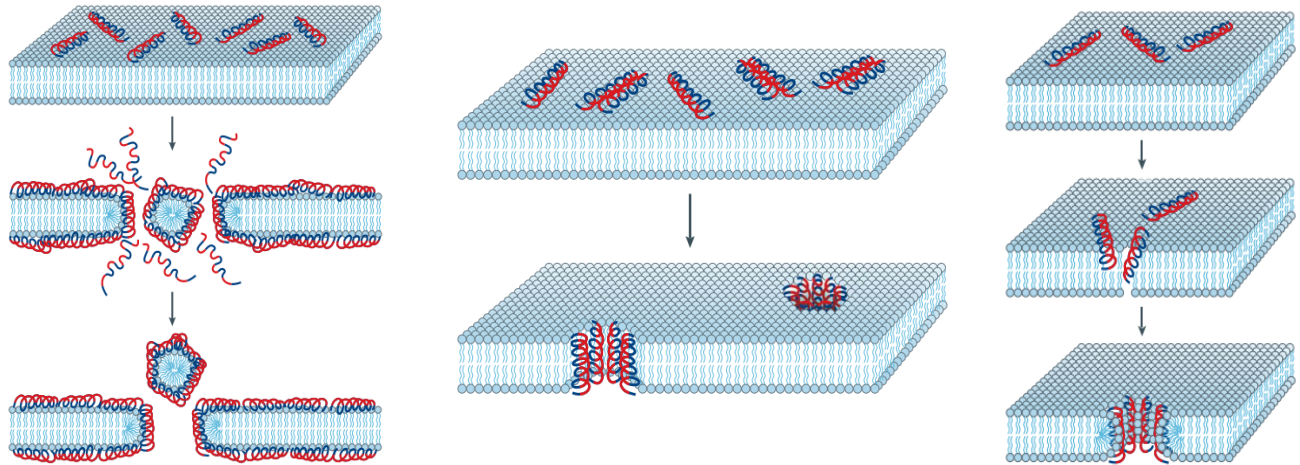


Figura 5. Modelos de acción de los AMPs. **Representación del modelo de barril** (en el medio), **alfombra** (izquierda) y **Poro toroidal** (derecha), las regiones hidrofílicas del AMP se observan de color rojo y las hidrofóbicas de color azul (Figura tomada de Brogden, 2005).

El diseño racional de AMPs es la optimización de péptidos en función de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales basado en su mecanismo de acción. Uno de los principales motivos para mejorar los AMPs es aumentar su actividad antimicrobiana y hacerlos más resistentes a la degradación por proteasas intracelulares, reduciendo a su vez la posible toxicidad que pudieran exhibir ante células del huésped. Entre las características esenciales a tener en cuenta en el diseño de AMPs que interactúan con la membrana se incluyen la carga neta, hidrofobicidad, anfipaticidad, flexibilidad y tamaño. Se han desarrollado estrategias racionales para el diseño de péptidos bioactivos (Figura 6), las cuales integran herramientas bioinformáticas y métodos moleculares (Torres et al., 2019). La generación de bibliotecas *in silico* puede realizarse mediante análisis combinatorios, que permitan generar variantes de una secuencia original a través de mutaciones puntuales, la cual es también es una estrategia ampliamente utilizada.

Con los recientes avances en inteligencia artificial, el análisis computacional *in silico* para mejorar la actividad de AMPs se ha convertido en una herramienta prometedora en el diseño de terapias antimicrobianas. A raíz de esto surge la reflexión ¿Somos recolectores o cazadores?, en donde se reafirma la creciente necesidad de comprender lo que estamos buscando para realizar diseños inteligentes, siendo cazadores y no remitirnos a reportar y utilizar lo que descubramos, siendo recolectores (Harrison et al., 2014).

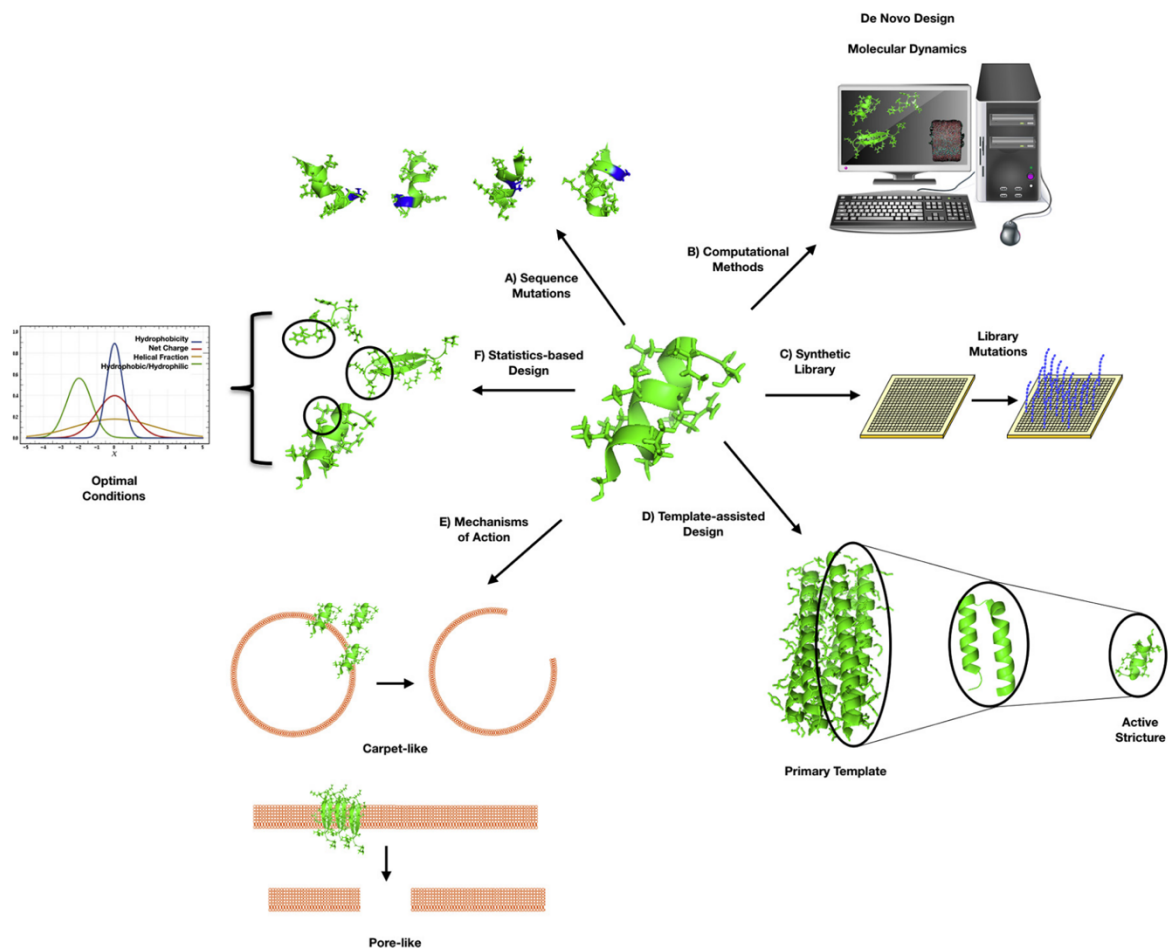


Figura 6. Estrategias para el diseño de péptidos antimicrobianos (AMPs). A) Introducción de mutaciones puntuales en la secuencia original para evaluar el impacto de aminoácidos específicos. B) Diseño *de novo* de péptidos a partir de principios estructurales y fisicoquímicos. C) Generación de bibliotecas sintéticas mediante combinaciones sistemáticas de aminoácidos. D) Diseño basado en plantillas derivadas de secuencias con actividad antimicrobiana comprobada. E) Uso de herramientas de simulación, como dinámica molecular, para predecir propiedades estructurales y funcionales. F) Aplicación de modelos estadísticos y algoritmos de aprendizaje para identificar parámetros relacionados con la actividad biológica (Figura tomada de Torres et al., 2019).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Un ejemplo de diseño optimizado de AMPs se encuentra en las magaininas, pequeños péptidos con estructura de α -hélice presentes en las secreciones cutáneas de algunos géneros de ranas tropicales. La magainina-2 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS, mag-2), uno de los péptidos más estudiados hasta la fecha, fue aislada de *Xenopus laevis* (Gregory et al., 2009; Balleza, 2023) y ha mostrado actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia (ATCC) de *S. aureus* (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 103.76, *E. coli* (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25.94 μM) y *P. aeruginosa* (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 51.88 μM). Posteriormente, Zasloff y colaboradores desarrollaron Pexiganan (GIGKFLKAKKFGKAFVKILKK-NH₂), a partir de la magainina (de carga +3) se generó

una variante optimizada con una carga neta aumentada a +10 y una amidación en el extremo C-terminal. Esta variante mejoró significativamente su actividad contra cepas ATCC de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI, por sus siglas en inglés) de 16 µg/mL (6.45 µM) para las tres especies (Gottler & Ramamoorthy, 2009).

Aunque hasta la fecha no se han aprobado terapias antimicrobianas derivadas del veneno de alacrán, diversos estudios han demostrado que la actividad de los AMPs de alacrán puede ser optimizada mediante mutagénesis dirigida. Un ejemplo de ello es AamAPI (FLFSLIPHAIGGLISAFK-NH₂), un péptido aislado de *Androctonus amoreuxi*, una especie de alacrán africano, que mostró actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia (NCTC) de *S. aureus*, *E. coli* y *Candida albicans*. En su forma nativa, AamAPI presentó baja actividad contra *E. coli* (120–150 µM), actividad moderada contra *C. albicans* (64 µM) y alta actividad contra *S. aureus* (20 µM). Sin embargo, al sustituir un residuo de histidina por lisina, la CMI disminuyó significativamente para todas las cepas evaluadas, alcanzando valores entre 3 y 5 µM (Almaaytah et al., 2012).

En otro estudio, Li y colaboradores determinaron la actividad antimicrobiana del péptido MK049518 (FLGLLGSVLGSVLPSIFK-NH₂) aislado del veneno de *Didymocentrus krausi*, un pequeño alacrán de los bosques secos de América Central. Este péptido presentó una CMI de 6.7 µM contra *S. aureus* pero baja actividad contra bacterias Gram-negativas (> 54.13 µM). Sin embargo, cuando se sustituyeron los residuos de serina por residuos de lisina, la actividad mejoró contra las bacterias Gram-negativas estudiadas (12.69 µM). Adicionalmente, la sustitución de residuos de glicina y serina por residuos de lisina disminuyó aún más la CMI contra *E. coli* (2.86 µM) y *P. aeruginosa* (5.73 µM) (Li et al., 2020).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Luna-Ramírez y colaboradores secuenciaron el transcriptoma de la glándula venenosa de *Urodacus yaschenkoi*, un alacrán endémico del desierto australiano e identificaron 210 secuencias codificantes para enzimas, toxinas y péptidos característicos de venenos de alacrán, de los cuales se encontró que el 21% codifican para péptidos antimicrobianos. Dentro de estas secuencias de AMPs se identificó la secuencia que codifica para el péptido Uy234 (FPFLLSLIPSAISAIKRL-NH₂) (Luna-Ramírez et al., 2015).

Cesa-Luna y colaboradores determinaron que el péptido Uy234 presenta una α -hélice anfipática, una carga neta de +3, 61% de residuos hidrofóbicos e índice de Boman de -0.74 kcal/mol, mismo que estima el potencial de un péptido para unirse a otras proteínas (Cesa-Luna et al., 2019). Se evaluó su actividad contra *Burkholderia cepacia*, un aislado clínico de *K. pneumoniae* y dos de *Streptococcus* sp., presentando la concentración mínima bactericida

(MBC, por sus siglas en inglés) contra los dos últimos, 2.9 y 5.9 μM , respectivamente. Sin embargo, el péptido Uy234 no presentó actividad contra *B. cepacia*; además que, en ensayos de actividad hemolítica, éste presentó un 26.18 % de hemólisis contra eritrocitos humanos a una concentración de 380 μM (Cesa-Luna et al., 2019).

Salazar-Hernández y colaboradores estudiaron la influencia de la flexibilidad y la carga neta en la actividad antimicrobiana del Uy234. Se encontró que el grupo amida del extremo C-terminal favorece la formación de puentes de hidrógeno, y la prolina central favorece la flexión del péptido provocando un efecto de torsión. Estos factores facilitarían la translocación del Uy234 cuando interactúan con la superficie membranal. Adicionalmente, se evaluó su actividad contra aislados clínicos de *S. aureus* MDR y cepas ATCC de *A. baumannii*, en los cuales se presentó una CMI de 6.25 μM y una concentración mínima bactericida, MCB, de 12.5 μM para *S. aureus* y CMI de 50 μM y MCB >100 μM (Salazar-Hernández et al., 2024).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento en la resistencia a antibióticos por el incremento de bacterias MDR requiere el desarrollo de nuevos fármacos, con lo que el diseño racional de AMPs mediante herramientas predictivas y de modelación *in silico* se posiciona como una de las posibles alternativas.

JUSTIFICACIÓN

Los AMPs cortos aislados del veneno de alacranes presentan actividad contra bacterias MDR, son poco costosos en su síntesis y, debido a que no tienen un sitio específico de unión al actuar en membranas lipídicas, se facilita su utilización contra un amplio espectro de bacterias, y de esta manera se dificulta la aparición de resistencia específica.

HIPÓTESIS

El diseño racional *in silico* nos permitirá obtener péptidos antimicrobianos derivados del Uy234 con una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las bacterias evaluadas en estudios anteriores.

Utilizar herramientas bioinformáticas permitirá el diseño de variantes optimizadas del Uy234. El incremento de la rigidez del péptido aumentará el grado de orden en su estructura tridimensional, lo que favorecerá su interacción con la membrana y se traducirá en una mayor actividad antimicrobiana. Asimismo, un mayor momento hidrofóbico facilitará la interacción con las regiones lipofílicas de la membrana, y mejorará su eficacia contra *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*. Dado que la prolina central favorece la flexión del péptido, eliminarla disminuirá su actividad antibacteriana.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar de manera racional, mediante el empleo de modelado y simulación *in silico*, un conjunto de péptidos derivados del péptido Uy234 con posible actividad antimicrobiana y caracterizar los mejores candidatos en términos de su actividad contra bacterias MDR. Se hará énfasis en mejorar el momento hidrofóbico y reducir la flexibilidad del péptido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener variantes del Uy234, mediante mutagénesis sitio-dirigida *in silico* y análisis combinatorios, llevando cabo lo descrito en los incisos a-f.
 - a) Aumentar en un giro de alfa hélice la longitud de la cadena peptídica del Uy234.
 - b) Incrementar la carga neta total a pH 7.0 (NCZ, por sus siglas en inglés) a (+1/+3)
 - c) Aumentar la rigidez de las variantes para estabilizar la helicidad de Uy234 y favorecer la interacción con la membrana bacteriana.
 - d) Incrementar la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico con respecto al péptido parental Uy234.
 - e) Diseñar una variante con una carga aniónica para favorecer la interacción con PE.
 - f) Diseñar una variante substituyendo la Prolina por Alanina
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de estas variantes frente a *S. aureus* y *A. baumannii*.
3. Determinar la actividad hemolítica de cada variante y compararla con la del péptido silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño racional de variantes del Uy234

Se realizaron bibliotecas *in silico* de 76 variantes del Uy234 mediante análisis combinatorios. La selección de variantes se llevó a cabo evaluando los parámetros fisicoquímicos más asociados con la actividad antimicrobiana, con el objetivo de predecir el potencial bioactivo de las secuencias propuestas.

- **Hidrofobicidad (H):** Se refiere al porcentaje de residuos hidrófobos dentro de un péptido, que es de aproximadamente el 50% para la mayoría de los péptidos antimicrobianos. Es una característica esencial para las interacciones AMP-membrana, y el nivel de hidrofobicidad se correlaciona con su toxicidad en células de mamíferos y la pérdida de especificidad antimicrobiana. Es una propiedad que mide la tendencia relativa

de un péptido a preferir un medio no acuoso frente a uno acuoso. Se calcula como el promedio de las constantes de hidrofobicidad de los aminoácidos que lo componen, de acuerdo con la escala de Fauchère y Pliska. Esta estimación, obtenida mediante la herramienta HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>), permite inferir la afinidad del péptido para incorporarse diferencialmente entre fases acuosas y lipídicas (Fauchère & Pliska, 1983).

- **Momento hidrofóbico (μH):** Medida de anfipaticidad que describe la capacidad de un péptido para orientarse respecto al eje perpendicular al plano de una bicapa lipídica. Se calcula mediante la ecuación de Eisenberg, la cual considera el promedio de los vectores hidrofóbicos de las cadenas laterales en función de la secuencia completa del péptido. Este parámetro, estimado con la herramienta **HeliQuest**, refleja la magnitud de un vector en el espacio 2D que impulsa al péptido en fase acuosa hacia la membrana, facilitando así la adopción de estructuras secundarias ordenadas (Eisenberg et al., 1982).
- **Carga neta (NCZ):** Corresponde a la suma total de las cargas eléctricas absolutas del péptido, incluyendo tanto las de las cadenas laterales como las de los grupos terminales, bajo la suposición de que el péptido se encuentra en un entorno con pH neutro. Este parámetro permite inferir la capacidad del péptido para interactuar con los grupos ionizados o polarizados presentes en los lípidos de la membrana bacteriana, mediante la formación de puentes salinos o interacciones ión-dipolo.
- **Ángulo θ de inclinación:** Corresponde al ángulo formado entre el eje de la hélice del péptido y la distancia desde su centro geométrico hasta la superficie de la membrana, considerando que el plano de la membrana se ubica a 180° . Este parámetro se determina utilizando las herramientas del servidor DBAASP (<http://dbaasp.org/tools?page=property-calculation>). Este parámetro describe la orientación idealizada del péptido con respecto al plano la membrana (Vishnepolsky & Pirtskhalava, 2014).
- **Flexibilidad intrínseca media (mBf):** Corresponde al promedio del factor B normalizado de los átomos que conforman cada aminoácido, y se utiliza como indicador del movimiento atómico y, en consecuencia, de la flexibilidad intrínseca de toda secuencia peptídica. Esta propiedad hace referencia a la libertad conformacional promedio de las cadenas laterales a lo largo de una secuencia peptídica, y se ha inferido a partir de datos de cristalografía de rayos X obtenidos a resoluciones muy altas para múltiples proteínas, tanto de membrana como citoplasmáticas. Experimentalmente, la flexibilidad intrínseca puede medirse mediante técnicas como la dispersión de rayos X o la RMN. Desde un enfoque bioinformático, se puede estimar mediante el algoritmo FlexiProt (<https://github.com/DBalleza-Flexiprot/Voltage-Sensor-Domain>), una herramienta que incluye estimaciones de los factores B correspondientes a los 20

aminoácidos proteinogénicos que pondera los factores B normalizados en función de los dos aminoácidos que se encuentran unidos al residuo de interés. Esta herramienta permite estimar la flexibilidad de un péptido directamente a partir de su secuencia primaria, proporcionando información sobre su capacidad para adoptar múltiples conformaciones estructurales (Balleza, 2023).

- **Momento dipolar (μ):** Parámetro cuantitativo de la polarización de un péptido, el cual depende de su estructura terciaria. Se determina la contribución de cada dipolo peptídico considerando las orientaciones de los grupos amino y carbonilo a lo largo de la cadena principal del péptido. Se calcula empleando el servidor PDMS (Protein Dipole Moments Server) (<https://dipole.proteopedia.org/>) que a su vez utiliza las coordenadas atómicas depositadas en un archivo PDB obtenido a través de AlphaFold 2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) o directamente en el PDB (Protein Data Bank). Determina el grado de ordenamiento del péptido y su posible estabilización una vez inserto y equilibrado con la membrana lipídica (Felder et al., 2007).
- **Energía electrostática total (ϕ):** Se refiere a la disposición espacial de las cargas totales y parciales del péptido representadas como nubes de potencial eléctrico. Se trata de una propiedad física igual en magnitud a la energía electrostática entre la distribución de carga estática de un sistema atómico o molecular que se calcula mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann, la cual considera la distribución de cargas de la molécula y las propiedades dieléctricas del medio circundante. El parámetro se realizó utilizando el software APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver; (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), considerando un pH fisiológico de 7.4 y empleando el campo de fuerza AMBER en sistemas moleculares simulando un medio acuoso. Se utiliza un archivo PDB con coordenadas atómicas específicas. Este parámetro permite comprender las interacciones iniciales entre el péptido y la membrana, particularmente el proceso de adsorción mediado por la atracción entre regiones de alto potencial electrostático en el péptido y el potencial electrostático de superficie de la monocapa externa en una típica membrana de fosfolípidos (Jurrus et al., 2018).
- **GRAVY (Grand Average of Hydropathy):** Se define como la suma de los valores de hidropatía de cada residuo, según la escala de Kyte y Doolittle, dividida entre el número total de aminoácidos en la secuencia. Este índice se utiliza para estimar la anfipaticidad de un péptido o proteína, y permite inferir su comportamiento en distintos entornos. Valores positivos del índice GRAVY se asocian con péptidos de mayor afinidad hacia entornos hidrofóbicos u oleosos, mientras que valores negativos reflejan una mayor solubilidad en medios acuosos. En este sentido, cuanto más negativo sea el valor de GRAVY en comparación con uno positivo, mayor será el carácter hidrofílico del péptido.

El valor obtenido fue calculado utilizando el servidor Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor de APD3 (<https://aps.unmc.edu/prediction>) (Kyte & Doolittle, 1982).

- **Índice de Wimley-White:** Este parámetro estima el potencial energético de partición de proteínas y péptidos en la interfaz membrana/agua. Está basado en una escala de hidrofobicidad interfacial que incluye la contribución del enlace peptídico determinada a partir de la partición de péptidos en interfaces de membranas fosfolipídicas neutras (zwitteriónicas). Para facilitar su interpretación, los resultados se multiplican por -1 . Los valores más negativos indican una mayor afinidad del péptido por permanecer en la membrana, mientras que los valores más positivos reflejan una mayor tendencia a permanecer en fase acuosa. El resultado fue obtenido en Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor de APD3 (Wimley & White, 1996).

Con el objetivo de respaldar el diseño racional, se utilizaron y exploraron dos bases de datos de péptidos antimicrobianos: APD3 y DBAASP (Feurstein et al., 2022).

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos antimicrobianos fueron sintetizados químicamente por la empresa ABclonal (Massachusetts, EE. UU.) con amidación en el sitio C-terminal y purificados mediante HPLC con una pureza mayor al 98 %. Las masas moleculares se confirmaron por espectrometría de masas.

Preparación de solución *stock* de AMPs

Todos los péptidos fueron disueltos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de su reconstitución, los viales fueron centrifugados brevemente para asegurar que el material liofilizado se concentrara en el fondo del tubo. Posteriormente, se disolvieron en una solución compuesta por 15 % de acetonitrilo y 75 % de agua tetradestilada, y se homogeneizaron completamente mediante pipeteo. Las soluciones *stock* (10 mg/ml) fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de variantes del Uy234

Se llevó a cabo la determinación la actividad antimicrobiana por ensayos cualitativos (Ensayos de Difusión Radial) y cuantitativos (CMI y CMB) de las variantes sintetizadas con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923 y *A. baumannii* AE12 (aislado clínico). Ambas cepas fueron proporcionadas por profesores del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP. Se utilizó el péptido Uy234, como control para comparar la actividad antibacteriana con las variantes, bajo las mismas condiciones.

Ensayos de Difusión Radial

Para la preparación del inóculo, se tomaron 500 μL de un cultivo o.n. (*overnight*; toda la noche) realizado en un tubo Falcon de 15 mL con 5 mL de caldo LB, el cual fue transferido a un tubo Falcon de 50 mL que contenía 25 mL de medio líquido LB. El cultivo fue incubado hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) a 625 nm entre 0.08 y 0.12, correspondiente a un estándar de McFarland de D.O= 0.5 (Andrews, 2006). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (METASH V-5100/UV-5100). A continuación, se realizó una dilución 1:10 del cultivo, y se colocaron 5 mL de la dilución sobre una placa con 20 mL de medio sólido LB. El cultivo se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la placa, se dejó reposar durante un minuto y se retiró el excedente. Posteriormente, se dejó secar durante 30 minutos con la tapa abierta, en la campana de flujo laminar. Finalmente, se depositó una gota de 10 μL de las siguientes soluciones sobre la superficie de la placa: péptido a evaluar, antibiótico control, agua tetradesilada y acetonitrilo al 15%. Cada gota fue colocada con una separación de 2 cm. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas en cámara de incubación (Salazar-Hernández et al., 2024). Cada experimento fue realizado por triplicado en al menos dos experimentos independientes.

Determinación de Concentración mínima inhibitoria por microdilución en caldo

Se utilizó la metodología recomendada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés), con las modificaciones propuestas por Li et al. (2014) y Salazar-Hernández et al. (2024) Para la preparación del inóculo, se tomaron 500 μL de un cultivo o.n., los cuales fueron inoculados en 5 mL de caldo LB. El cultivo fue incubado hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (O.D600). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (METASH V-5100/UV-5100). Posteriormente, se realizó una dilución hasta obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. El número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se estimó mediante el método de goteo en placa, en un análisis por triplicado (Muñoz-Rojas et al., 2016). Para el ensayo, se diluyó cada péptido en medio líquido LB a una concentración inicial de 200 μM . Se depositaron 145 μL de la dilución inicial en cada pozo de una placa ELISA, y se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta obtener una concentración mínima de 1.5 μM . A cada pozo se añadieron 5 μL del inóculo bacteriano previamente ajustado a 5×10^5 UFC/mL. Se incluyeron los siguientes controles: Control negativo (-): 90 μL de LB + 5 μL de inóculo bacteriano + 5 μL de antibiótico; Control positivo (+): 95 μL de LB + 5 μL de inóculo bacteriano; Control de medio (-): 100 μL de LB; Control de solvente (+): 15 μL de acetonitrilo + 5 μL de inóculo bacteriano + 80 μL de LB. La absorbancia de cada pozo se midió en un lector de placas ELISA (BioTek ELx800 Microplate Reader) antes y después de una incubación de 16 horas a 180 rpm (Li et al., 2014; Salazar-Hernández et al., 2024). La CMI se definió como la concentración más baja en la cual no se detectó un aumento de absorbancia. Cada experimento fue realizado por triplicado en al menos dos experimentos independientes.

Determinación de Concentración Mínima Bactericida

Utilizando las muestras de las placas de ELISA del procedimiento anterior de CMI, se utilizó un replicador de metal para garantizar una transferencia simultánea de los microorganismos, los cuales fueron posteriormente inoculados en una placa de medio sólido LB. La CMB se definió como la concentración más baja a la cual no se observa crecimiento celular (Cesa-Luna et al., 2019). Cada experimento fue realizado por triplicado en al menos dos experimentos independientes.

Determinación de la actividad citotóxica de las variantes del Uy234

La actividad hemolítica de las variantes del péptido Uy234 se evaluó con base en el procedimiento descrito por Luna-Ramírez et al. (2013) y Cesa-Luna et al. (2019), con ligeras modificaciones. Para ello, se utilizaron eritrocitos humanos obtenidos de una donante femenina sana con tipo de sangre O+. Las muestras fueron recolectadas por venopunción y cuantificadas en un hemocitómetro (Synlab, México). Los eritrocitos fueron lavados tres veces con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %) mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 5 minutos (Luna-Ramírez et al., 2013). En cada lavado, se cuantificó el volumen de plasma extraído y se reemplazó con un volumen equivalente de solución salina para mantener la estabilidad osmótica y prevenir hemólisis espontánea. Posteriormente, la suspensión de eritrocitos se ajustó a una concentración final de 4.4×10^6 células/mL, siguiendo el protocolo de Cesa-Luna et al. (2019). Una vez realizado el ajuste, se colocaron 195 μ L de la suspensión de eritrocitos en microtubos (Eppendorf) y se agregaron 5 μ L de las variantes en las siguientes concentraciones: 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M y 3.1 μ M. Los microtubos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se incluyeron los siguientes controles: Control negativo: 200 μ L de la suspensión de eritrocitos en solución salina fisiológica. Control positivo: 200 μ L de la suspensión de eritrocitos en SDS al 10% (dodecilsulfato de sodio, por sus siglas en inglés), correspondiente al 100% de lisis. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos (Cesa-Luna et al., 2019). Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a una placa ELISA y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas ELISA (BioTek ELx800 Microplate Reader) (Humpola et al., 2023).

La actividad hemolítica se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Hemólisis} = \left(\frac{A_{\text{péptido}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control positivo}} - A_{\text{blanco}}} \right) \times 100$$

Cada determinación se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de variantes peptídicas derivadas de la secuencia del péptido Uy234

En una serie de etapas numeradas del 1 al 4, se llevó a cabo el diseño de variantes derivadas del péptido Uy234. La combinatoria se realizó mediante la siguiente fórmula para ordenaciones con repetición de m elementos de un conjunto tomadas de n en n , en donde m indica el número de elementos disponibles y n el número de posiciones a tomar.

$$VR_{m,n} = m^n.$$

Etapa (1): Se generaron variantes del péptido Uy234 mediante la sustitución de la alanina en el residuo 14 por un residuo de arginina. Además, se incrementó la hidrofobicidad sustituyendo las leucinas en los residuos 4 y 5, por isoleucina y valina al ser aminoácidos más hidrofóbicos según la escala de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). La fórmula utilizada para calcular el número total de variantes fue:

$$(VR_{3,1} \cdot VR_{3,1} \cdot VR_{2,1}) - 1 = 17$$

$VR_{3,1}$ corresponde a L4, la segunda $VR_{3,1}$ corresponde a L5 y $VR_{2,1}$ corresponde a A14; y se excluye la secuencia del péptido parental (Uy234). Este conjunto de variantes se nombraron variantes-R, haciendo referencia al residuo de arginina en la posición 14 del péptido base. Se eligió este residuo dado que, según reportes previos, la arginina, a diferencia de la lisina, tiene la capacidad de formar múltiples puentes de hidrógeno con diversas cabezas lipídicas a través de su grupo guanidinio (Koller & Lohner, 2014). Por otro lado, es ampliamente aceptado que el incremento de la hidrofobicidad está relacionado con un aumento en la actividad antimicrobiana (Chen et al., 2007). En consecuencia, se realizaron modificaciones en la cara hidrofóbica del péptido con el objetivo de potenciar esta propiedad. Adicionalmente, se diseñó una variante con una mutación puntual, en la cual se sustituyó la prolina central por un residuo de alanina, ampliamente reconocido como estabilizador de cadenas α -helicoidales (Koller & Lohner, 2014). Esta modificación se realizó con base en estudios previos de simulaciones de dinámica molecular, que han demostrado que dicha prolina genera un efecto de flexión "*bending effect*" crucial para la actividad antimicrobiana del péptido Uy234 (Salazar-Hernández et al., 2024).

Se generaron 18 variantes, de las cuales se eligió la variante Uy234-A y la variante Uy234-R7 (Tabla 2). La sustitución de la prolina central (P9) por alanina provocó un cambio en el valor estimado del ángulo de inclinación del péptido con respecto al eje perpendicular al plano de la membrana. Dicho cambio se interpreta como una mayor inclinación del péptido respecto a la bicapa lipídica, lo cual podría influir en su actividad antimicrobiana. Otro cambio notable fue el aumento en la rigidez estructural del péptido. La torsión generada por

el efecto de flexión confería una flexibilidad localizada en la estructura del péptido (Salazar-Hernández et al., 2024). Al eliminar dicho efecto, se favoreció la formación de una α -hélice más ordenada, lo que resultó en una disminución de la flexibilidad intrínseca del péptido (de mBf = 1.793 a mBf = 1.673).

La primera variable seleccionada para discriminar entre las variantes generadas fue el momento hidrofóbico (μ H), dado que un incremento en este parámetro se ha asociado con una mayor capacidad de unión e inserción del péptido en la membrana celular (Takechi-Haraya et al., 2022). Respecto a la secuencia original, las variantes Uy234-R1, R3, R4, R5, R6, R7, R9, R12 y R13 aumentaron su μ H (Tabla 3). Paralelamente, dado que uno de los objetivos en este trabajo fue aumentar la carga neta, las variantes Uy234-R4, R6 y R12 fueron descartadas. Una tercera variable fue la flexibilidad intrínseca. Se ha propuesto que esta propiedad influye significativamente en la actividad de los péptidos antimicrobianos, siendo los más rígidos aquellos capaces de generar mayores tensiones sobre la membrana, provocando defectos en el empaquetamiento lipídico y contribuyendo a su desestabilización (Liu et al., 2013). Bajo este criterio, la variante **Uy234-R7** fue seleccionada, al presentar el menor incremento en flexibilidad (mBf = 1.88) con respecto al péptido original (mBf = 1.793).

Tabla 2. Secuencias obtenidas del primer análisis combinatorio. En fondo azul se encuentra la secuencia de Uy234. Las variantes con fondo color amarillo representan a las variantes elegidas derivadas del análisis. Los aminoácidos en color rojo indican aquellas posiciones substituidas.

Variante	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-A	F	P	F	L	L	S	L	I	A	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R1	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R2	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R3	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R4	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R5	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R6	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R7	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R8	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R9	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R10	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R11	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R12	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R13	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R14	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R15	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L
Uy234-R16	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L
Uy234-R17	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	A	I	S	R	I	K	R	L

Las variantes Uy234-R que mostraron una disminución en la hidrofobicidad también presentaron un momento dipolar menor en comparación con el péptido original Uy234 (Tabla 2), lo que sugiere una reducción en la polarización global de la molécula al incorporar un residuo catiónico en el extremo C-terminal. Asimismo, todas las variantes Uy234-R exhibieron un índice WW superior, lo que indica una mayor afinidad por la fase acuosa en comparación con la secuencia nativa.

Este comportamiento también se observa en el péptido VmCT1 ($H = 0.820$), cuyo índice WW aumentó su energía libre de -3.20 kcal/mol a -2.40 kcal/mol tras la sustitución de una glicina por arginina ($H = 0.742$), a -2.81 kcal/mol cuando se reemplazó una asparagina ($H = 0.788$) por el mismo residuo, y a -2.52 kcal/mol al sustituir una serina ($H = 0.745$). Estos cambios reflejan una disminución en la hidrofobicidad y una mayor afinidad por el medio acuoso, en concordancia con lo observado en las variantes Uy234-R, donde se utilizó el mismo residuo en tales sustituciones (Fong-Coronado et al., 2024).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 2. Las variantes en color amarillo representan a las variantes elegidas derivadas del análisis. La fila en negritas contiene los datos de Uy234.

Variante	H	μH	NCZ	θ (°)	mBf	μ (D)	φ (kJ/mol)	GRAVY	WW-index (kcal/mol)
Uy234	0.873	0.467	(+1/+2)	84	1.793	162	1.234 E4	1.327	-2.00
Uy234-A	0.851	0.480	(+1/+2)	40	1.673	178	1.236 E4	1.517	-2.28
Uy234-R1	0.800	0.483	(+1/+3)	83	1.903	139	1.739 E4	0.978	-1.36
Uy234-R2	0.879	0.468	(+1/+2)	82	1.784	161	1.450 E4	1.367	-1.75
Uy234-R3	0.806	0.485	(+1/+3)	82	1.893	138	1.542 E4	1.017	-1.11
Uy234-R4	0.879	0.473	(+1/+2)	84	1.789	161	1.372 E4	1.367	-1.75
Uy234-R5	0.806	0.488	(+1/+3)	83	1.898	138	1.363 E4	1.017	-1.11
Uy234-R6	0.884	0.473	(+1/+2)	82	1.780	163	1.209 E4	1.405	-1.50
Uy234-R7	0.811	0.489	(+1/+3)	82	1.888	127	1.168 E4	1.055	-0.86
Uy234-R8	0.847	0.464	(+1/+2)	65	1.787	163	1.170 E4	1.350	-1.37
Uy234-R9	0.773	0.476	(+1/+3)	77	1.897	120	1.396 E4	1.000	-0.17
Uy234-R10	0.847	0.442	(+1/+2)	78	1.796	159	1.271 E4	1.350	-1.37
Uy234-R11	0.773	0.459	(+1/+3)	77	1.907	125	1.499 E4	1.000	-0.73
Uy234-R12	0.852	0.470	(+1/+2)	65	1.783	158	1.215 E4	1.389	-1.12
Uy234-R13	0.779	0.481	(+1/+3)	77	1.892	137	1.379 E4	1.039	-0.48
Uy234-R14	0.852	0.443	(+1/+2)	77	1.787	158	1.273 E4	1.389	-1.12
Uy234-R15	0.779	0.461	(+1/+3)	76	1.896	124	1.710 E4	1.039	-0.48
Uy234-R16	0.820	0.439	(+1/+2)	65	1.791	158	1.081 E4	1.372	-1.17
Uy234-R17	0.747	0.452	(+1/+3)	70	1.900	136	1.246 E4	1.022	-0.53

El aumento de tamaño incrementó la flexibilidad en la mayoría de las variantes

Etapa (2): Con el propósito de incrementar la actividad membranolítica del péptido contra bacterias Gram negativas, se diseñaron péptidos con incremento en un giro de α -hélice en el extremo C-terminal. Esta decisión se fundamenta en estudios previos que reportan que los péptidos de mayor longitud (21–28 aminoácidos) presentan una mejor actividad antibacteriana, ya que son capaces de atravesar completamente el núcleo hidrofóbico de la membrana (Grau-Campistany et al., 2015); aunque también existen reportes de péptidos cortos muy activos contra diferentes bacterias patógenas (Fong-Coronado et al., 2024). La adición se realizó específicamente en el extremo C-terminal, dado que la secuencia Phe-Pro-Phe se encuentra ligeramente más conservada en otros péptidos de características similares, según un alineamiento (Figura 7) realizado utilizando la base de datos APD3. La combinatoria se realizó mediante la siguiente fórmula para ordenaciones sin repetición de m elementos de un conjunto tomadas de n en n :

$$V_{n,r} = \frac{n!}{(n-r)!}$$

En la fórmula, $V_{n,r}$ indica el número de variaciones, n representa el número total de elementos disponibles, r corresponde al número de elementos que se van a escoger, y $n!$ denota el factorial de n , es decir, el producto de todos los números enteros desde 1 hasta n .

Para evitar una disminución considerable en la hidrofobicidad del péptido, se incorporó un residuo de isoleucina, el aminoácido más hidrofóbico de acuerdo con la escala de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Considerando que el extremo C-terminal presenta alta frecuencia de residuos polares, se seleccionó un aminoácido con características similares. Debido a que los péptidos cortos derivados de veneno de alacrán, como el Uy234, no contienen enlaces disulfuro, se descartó la inclusión de residuos de cisteína (Fong-Coronado et al., 2024). En su lugar, se evaluaron combinaciones con serina, treonina, asparagina y glutamina (Tabla 4). Finalmente, se aumentó la carga neta del péptido mediante la adición de un residuo de arginina, en concordancia con los argumentos previamente expuestos. De esta manera, la fórmula utilizada para calcular el número total de variantes fue:

$$\binom{4}{1} \cdot V_{R,3,3} = 24$$

Correspondiendo a la fracción, el numerador (4) representa los cuatro grupos distintos de aminoácidos considerados: IRS, IRT, IRN e IRQ, mientras que el denominador (1) indica que se seleccionó un solo grupo a la vez para realizar las permutaciones. La expresión $V_{R,3,3}$

indica que, de un total de tres aminoácidos diferentes en cada grupo, se tomaron los tres y se permutaron entre sí en todas las posiciones posibles, sin repetición. El cálculo se expresa mediante el uso de números factoriales. El factorial de un número entero positivo n , denotado como $n!$ representa el producto de todos los enteros positivos desde 1 hasta n .

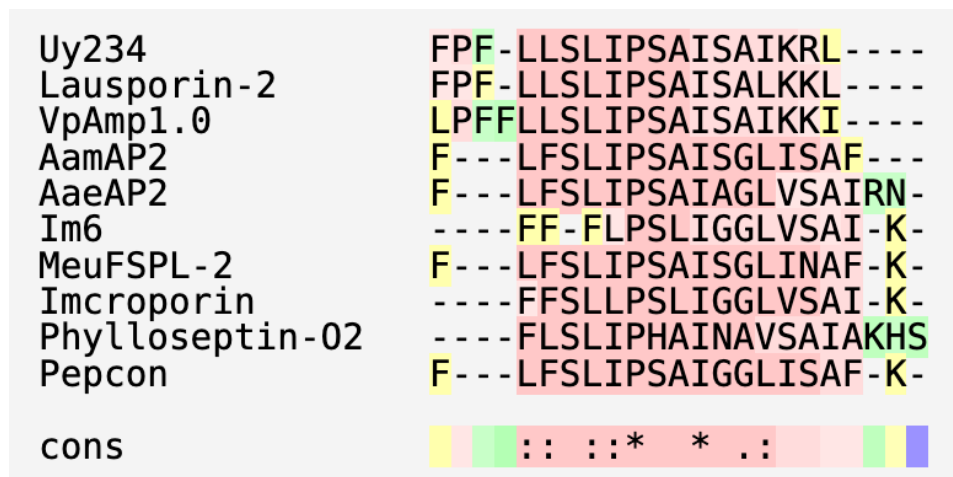


Figura 7. Alineamiento de la secuencia del péptido Uy234 con péptidos similares reportados en APD3. El alineamiento fue realizado en T-COFFEE, Version_11.00. Morado o verde= mal alineamiento; Amarillo= promedio y Rosa: buen alineamiento.

De manera similar al criterio aplicado en el diseño de Uy234-R7, se seleccionaron aquellas variantes que presentaron un incremento en su momento hidrofóbico, identificándose las variantes Uy234-IR1, IR2, IR7, IR8, IR9, IR10, IR11 e IR12 (Tabla 5). Dado que todas estas variantes conservan la misma carga neta, dicho parámetro fue descartado como criterio de selección, y se procedió a evaluar los valores de flexibilidad intrínseca. En este análisis, las variantes Uy234-IR9 y Uy234-IR11 fueron las únicas que mostraron un aumento en su rigidez (Tabla 5); sin embargo, se seleccionó Uy234-IR9 debido a su momento hidrofóbico superior. Además, se observó un incremento en el momento dipolar, lo que sugiere un mayor grado de ordenamiento en Uy234-IR9 en comparación con Uy234-IR11. La secuencia **FPFLLSLIPSAISAIKRLIRT** fue empleada como plantilla para el diseño de dos variantes adicionales.

Tabla 4. Secuencias obtenidas del segundo análisis combinatorio. En azul se encuentra la secuencia de Uy234. La variante en color amarillo representa a la variante elegida derivada del análisis. Los aminoácidos en color rojo indican aquellas posiciones substituidas.

Variante	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	*	*	*
Uy234-IR1	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	S
Uy234-IR2	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	S	R
Uy234-IR3	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	I	S
Uy234-IR4	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	S	I
Uy234-IR5	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	S	I	R
Uy234-IR6	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	S	R	I
Uy234-IR7	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	Q
Uy234-IR8	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	N
Uy234-IR9	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-IR10	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	Q	R
Uy234-IR11	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	T	R
Uy234-IR12	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	N	R
Uy234-IR13	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	I	Q
Uy234-IR14	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	I	N
Uy234-IR15	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	I	T
Uy234-IR16	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	Q	I
Uy234-IR17	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	N	I
Uy234-IR18	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	R	T	I
Uy234-IR19	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	Q	I	R
Uy234-IR20	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	N	I	R
Uy234-IR21	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	T	I	R
Uy234-IR22	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	Q	R	I
Uy234-IR23	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	N	R	I
Uy234-IR24	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	T	R	I

Tabla 5. Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 4. La variante resaltada en color amarillo representa a la variante elegida para síntesis, derivada del análisis de sus propiedades fisicoquímicas.

Variante	H	μ H	NCZ	θ (°)	mBf	μ (D)	ϕ (kJ/mol)	GRAVY	WW-index (kcal/mol)
Uy234	0.873	0.467	(+1/+2)	84	1.793	162	1.234 E4	1.327	-2.00
Uy234-IR1	0.784	0.504	(+1/+3)	84	1.811	175	1.840 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR2	0.784	0.498	(+1/+3)	83	1.798	163	1.552 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR3	0.784	0.299	(+1/+3)	79	1.806	176	1.633 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR4	0.784	0.344	(+1/+3)	84	1.841	164	1.503 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR5	0.784	0.366	(+1/+3)	86	1.805	173	1.174 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR6	0.784	0.411	(+1/+3)	87	1.841	168	1.813 E4	1.10	-1.37
Uy234-IR7	0.776	0.508	(+1/+3)	85	1.822	169	1.918 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR8	0.758	0.518	(+1/+3)	83	1.818	171	1.633 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR9	0.799	0.497	(+1/+3)	85	1.786	175	1.609 E4	1.104	-1.36
Uy234-IR10	0.776	0.504	(+1/+3)	84	1.805	166	1.660 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR11	0.799	0.489	(+1/+3)	83	1.783	163	2.045 E4	1.104	-1.36
Uy234-IR12	0.758	0.516	(+1/+3)	84	1.800	162	2.076 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR13	0.776	0.304	(+1/+3)	78	1.813	171	1.628 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR14	0.758	0.314	(+1/+3)	77	1.808	179	1.648 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR15	0.799	0.292	(+1/+3)	82	1.791	174	1.595 E4	1.104	-1.36
Uy234-IR16	0.776	0.352	(+1/+3)	83	1.850	169	1.500 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR17	0.758	0.369	(+1/+3)	82	1.844	168	1.564 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR18	0.799	0.331	(+1/+3)	85	1.826	160	1.534 E4	1.104	-1.36
Uy234-IR19	0.776	0.359	(+1/+3)	80	1.817	174	1.605 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR20	0.758	0.343	(+1/+3)	82	1.815	168	1.786 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR21	0.799	0.379	(+1/+3)	87	1.795	177	1.935 E4	1.104	-1.36
Uy234-IR22	0.776	0.407	(+1/+3)	85	1.850	173	1.464 E4	0.971	-0.92
Uy234-IR23	0.758	0.397	(+1/+3)	82	1.844	177	1.597 E4	0.971	-1.08
Uy234-IR24	0.799	0.419	(+1/+3)	88	1.813	144	1.540 E4	1.104	-1.36

Todas las variantes incrementaron su potencial electrostático, lo cual puede ser atribuido a la distribución de las cargas derivado del incremento de tamaño, más que al incremento de la carga neta; esto en comparación con las variantes Uy234-R (Tabla 3), las cuales no incrementaron este parámetro. Similar a lo observado en las variantes Uy234-R, la disminución en la hidrofobicidad se tradujo en un incremento del índice de WW. Este comportamiento se correlaciona a su vez con una disminución del valor GRAVY, lo cual indica una mayor solubilidad en medio acuoso en comparación con el péptido original Uy234.

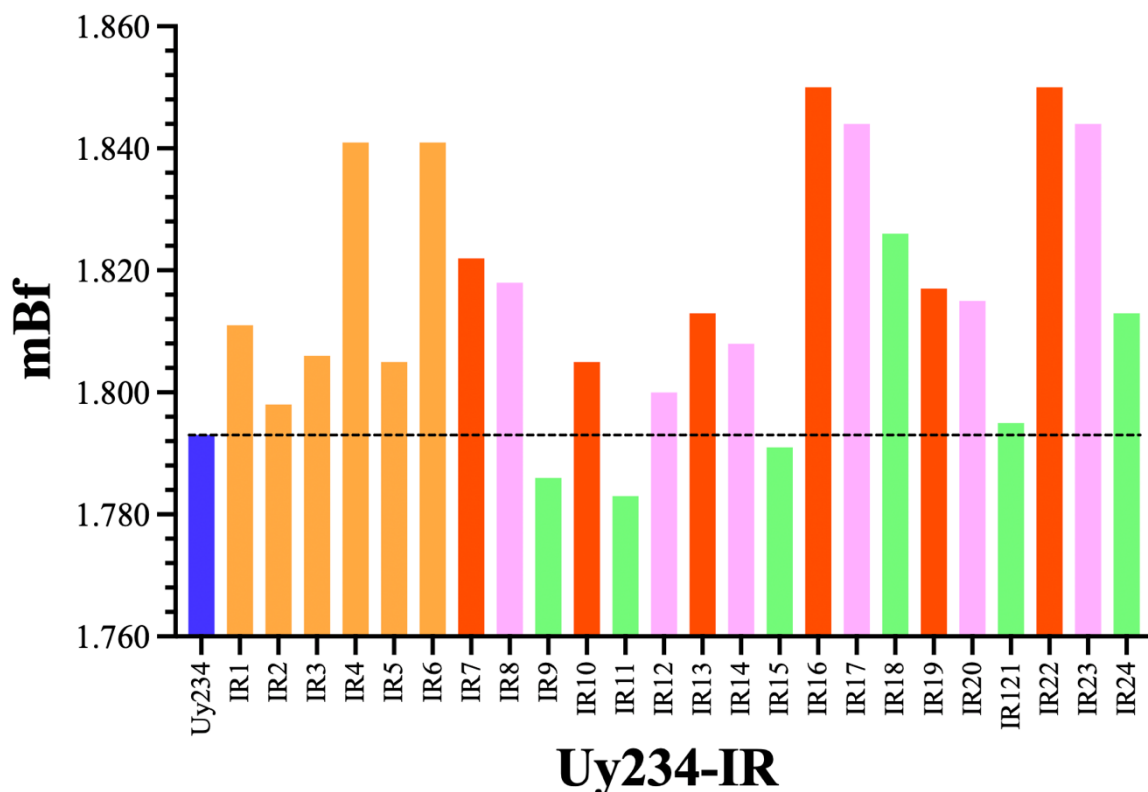


Figura 8. Flexibilidad intrínseca de las variantes -IR. La barra en color azul representa al Uy234. Las barras en color naranja representan a las variantes con Serina. Las barras en color rojo representan a las variantes con Glutamina. Las barras en color magenta representan a las variantes con Asparagina. Las barras en color verde representan a las variantes con Treonina. El programa GraphPad Prism versión 10.0 para Mac fue utilizado para realizar los gráficos.

La adición de Triptófano elevó el momento hidrofóbico y la rigidez de las variantes

El triptófano juega un papel clave en el diseño de AMPs debido a su notable capacidad para facilitar la adhesión de cadenas polipeptídicas en membranas biológicas, lo que potencia su actividad antimicrobiana (Feurstein et al., 2022; Kowalska-Baron et al., 2015). Esta propiedad se atribuye a la estructura particular de su grupo indol, el cual tiende a orientarse en la interfaz de la bicapa lipídica (Figura 9). La ubicación interfacial de la cadena lateral del triptófano puede explicarse por diversos factores, entre ellos el efecto hidrofóbico que favorece su inserción en la membrana, las interacciones catión- π con grupos polares como la colina de la PC o los grupos -OH del PG, y las interacciones electrostáticas entre el dipolo del indol y el campo eléctrico de la bicapa (Norman & Nymeyer, 2006; Kumar et al., 2018).

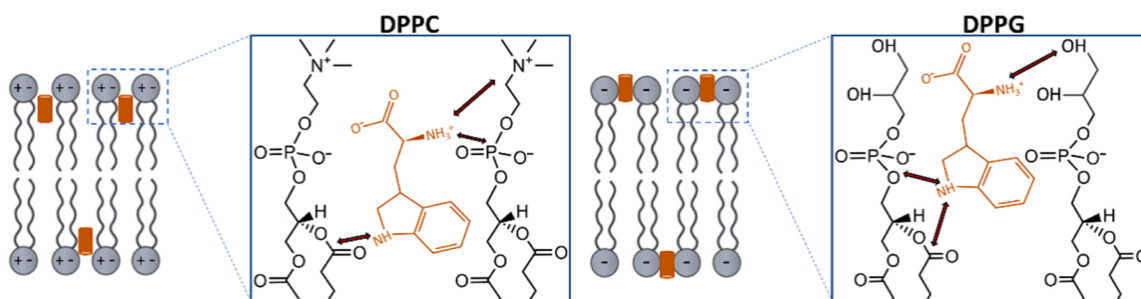


Figura 9. Representación de las interacciones del Triptófano con membranas modelo de lípidos zwitterionnicos. (DPPC, Dipalmitoilfosfatidilcolina) (DPPG, Dipalmitoilfosfatidilglicerol) (Figura tomada de Guglielmelli et al., 2023)

Etapa (3): Con el objetivo de identificar las posiciones óptimas para incorporar un residuo de triptófano se sustituyó la alanina central (A12) (Tabla 7). Considerando el carácter anfipático del triptófano, este se posicionó estratégicamente en la región central de la secuencia, en la zona de transición entre las caras hidrofóbica e hidrofílica del péptido. Adicionalmente, se llevaron a cabo modificaciones en la cara hidrofóbica, siguiendo un enfoque similar al aplicado en el primer análisis combinatorio. La fórmula utilizada para calcular el número total de variantes fue:

$$(V_{R3,1} \cdot V_{R3,1} \cdot V_{R2,1}) = 18$$

$V_{R3,1}$ corresponde a L4, la segunda $V_{R3,1}$ corresponde a L5 y $V_{R2,1}$ corresponde a A12.

Las variantes con valina presentaron un menor momento dipolar comparando con las variantes con isoleucina y/o leucina, lo que se traduce como un mayor ordenamiento del péptido con esta combinación de aminoácidos (Tabla 7). La elección de estos corresponde al argumento de la hidrofobicidad, explicado anteriormente. La adición de triptófano en la región central de la secuencia incrementó el momento hidrofóbico de las variantes generadas y aumentó su rigidez (Tabla 7), un resultado previsible dada la estructura rígida del grupo indol, con limitados grados de libertad conformacional (Feurstein et al., 2022; Kowalska-Baron et al., 2015 (Feurstein et al., 2022; Kowalska-Baron et al., 2015)). De igual forma, las variantes sin Triptófano presentaron una mayor energía libre asociada a la partición en interfaces, representada por el índice de WW, lo que confirma lo argumentado anteriormente. La variante Uy234-RT8 presentó el mayor incremento tanto en su momento hidrofóbico como en su rigidez, por lo que fue seleccionada para su posterior síntesis. Igualmente, esta variante fue la que presentó un mayor valor de hidrofobicidad ($H = 0.900$).

Comparativamente, el péptido VpCT3 también presentó un aumento del momento hidrofóbico (de 0.75 a 0.76), un aumento en el índice WW (de -1.69 kcal/mol a -3.23 kcal/mol) y un incremento en la rigidez (de 1.84 a 1.82 mBf) tras la sustitución de una isoleucina por un triptófano en la región central de la secuencia (Fong-Coronado et al., 2024). Este patrón coincide con lo observado en las variantes Uy234-RT, lo que refuerza la relación

entre sustituciones puntuales en residuos hidrofóbicos y los cambios en propiedades fisicoquímicas clave.

Tabla 6. Secuencias obtenidas del tercer análisis combinatorio. En azul se encuentra la secuencia de Uy234. La variante resaltada en amarillo representa a la variante elegida derivada del análisis. Los aminoácidos en color rojo indican aquellas posiciones substituidas. La variante Uy234-IR9, listada en la Tabla 3, se representa aquí como Uy234-RT1.

Variante	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT1	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT2	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT3	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT4	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT5	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT6	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT7	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT8	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT9	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT10	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT11	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT12	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT13	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT14	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT15	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT16	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT17	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T
Uy234-RT18	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	R	T

Tabla 7. Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 6. La variante resaltada en amarillo representa a la variante elegida para síntesis química, derivada del análisis. **La fila en negritas contiene los datos de Uy234.** La variante Uy234-IR9, listada en la Tabla 3, se representa aquí como Uy234-RT1.

Variante	H	μ H	NCZ	θ (°)	mBf	ρ (D)	ϕ (kJ/mol)	GRAVY	WW-index (kcal/mol)
Uy234	0.873	0.467	(+1/+2)	84	1.793	162	1.234 E4	1.327	-2.00
Uy234-RT1	0.799	0.497	(+1/+3)	85	1.786	175	1.609 E4	1.104	-1.36
Uy234-RT2	0.891	0.571	(+1/+3)	87	1.765	174	1.596 E4	1.065	-3.51
Uy234-RT3	0.803	0.497	(+1/+3)	84	1.779	174	1.525 E4	1.138	-1.11
Uy234-RT4	0.896	0.571	(+1/+3)	83	1.757	173	1.847 E4	1.009	-3.13
Uy234-RT5	0.803	0.501	(+1/+3)	85	1.783	174	1.417 E4	1.138	-1.11
Uy234-RT6	0.896	0.575	(+1/+3)	87	1.761	173	1.408 E4	1.009	-3.13
Uy234-RT7	0.808	0.502	(+1/+3)	84	1.775	184	1.346 E4	1.171	-0.86
Uy234-RT8	0.900	0.576	(+1/+3)	83	1.754	170	1.790 E4	1.042	-2.88
Uy234-RT9	0.776	0.493	(+1/+3)	78	1.782	171	1.893 E4	1.123	-0.73
Uy234-RT10	0.868	0.570	(+1/+3)	82	1.760	164	1.899 E4	0.995	-2.75
Uy234-RT11	0.776	0.475	(+1/+3)	83	1.789	171	1.652 E4	1.123	-0.73
Uy234-RT12	0.868	0.549	(+1/+3)	82	1.767	168	1.490 E4	0.995	-2.75
Uy234-RT13	0.780	0.498	(+1/+3)	78	1.778	166	1.501 E4	1.157	-0.48
Uy234-RT14	0.873	0.574	(+1/+3)	82	1.757	162	1.645 E4	1.028	-2.50
Uy234-RT15	0.780	0.476	(+1/+3)	79	1.782	159	1.655 E4	1.157	-0.48
Uy234-RT16	0.873	0.549	(+1/+3)	82	1.760	166	1.687 E4	1.028	-2.50
Uy234-RT17	0.753	0.471	(+1/+3)	73	1.785	166	1.596 E4	1.142	-0.09
Uy234-RT18	0.845	0.547	(+1/+3)	80	1.763	165	1.657 E4	1.014	-2.12

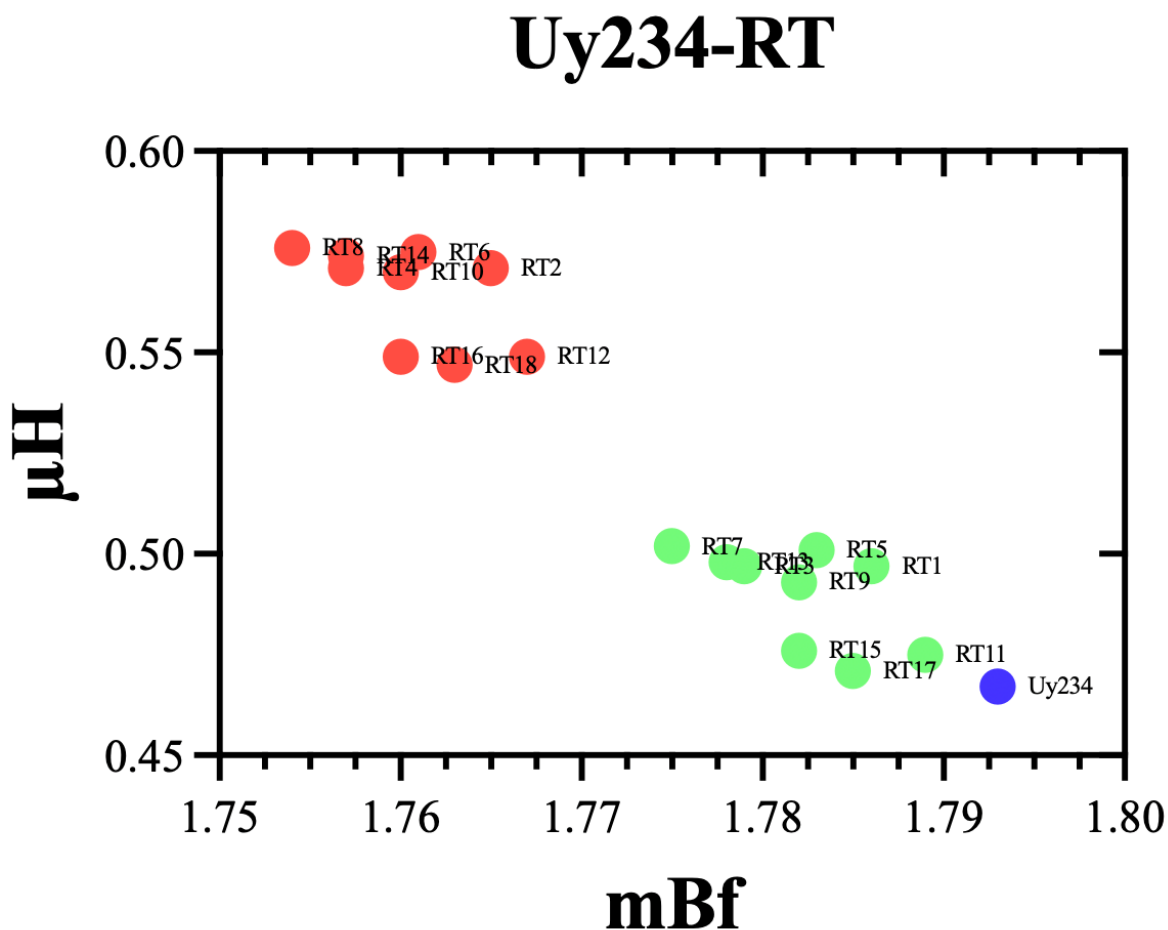


Figura 10. Flexibilidad intrínseca contra momento hidrofóbico de las variantes -RT. La variante en color azul representa al Uy234. Las variantes en color verde representan a las variantes sin Triptófano. Las variantes en color rojo representan a las variantes con Triptófano. GraphPad Prism versión 10.0 para Mac fue utilizado para realizar los gráficos.

El Ácido aspártico aumentó el momento dipolar de las variantes

Acinetobacter baumannii posee gran relevancia clínica como patógeno oportunista, ya que se trata de un patógeno responsable de infecciones intrahospitalarias y se caracteriza por poseer múltiples mecanismos de resistencia ante muchos antibióticos (Chang-Ro et al., 2017). Las membranas de *A. baumannii* son abundantes en PE, un lípido zwitteriónico (Lopalco et al., 2017; Kamischke et al., 2019). Comprender la fisiología de membranas ricas en este tipo de lípidos resulta crucial para el diseño racional de AMPs. A diferencia del fosfatidilglicerol (PG), que tiende a formar bicapas lamelares planas a temperatura ambiente debido a su conformación cilíndrica y grado de saturación, la fosfatidiletanolamina (PE) adopta una conformación cónica que favorece la inducción de curvaturas negativas en la membrana. Esta curvatura genera segregación lateral de lípidos y promueve un alto grado

de desorden estructural, lo cual incrementa la susceptibilidad de la membrana a la acción de AMPs (Koller & Lohner, 2014)

Se diseñó una nueva variante del péptido Uy234 a partir del molde Uy234-IR9, en la cual se sustituyó una treonina por un residuo de ácido aspártico (Tabla 8). Esta modificación busca favorecer la formación de interacciones electrostáticas, como puentes salinos, con lípidos basados en PE. Las otras combinaciones en este tercer análisis combinatorio fueron realizadas de la misma forma que en el análisis anterior. Dado que todas las variantes Uy234-DR presentaron un incremento en su momento hidrofóbico (Tabla 9), se utilizó la flexibilidad intrínseca como criterio adicional de selección. Bajo este enfoque, **Uy234-DR8** fue identificada como la variante Uy234-DR más rígida. Además, esta variante presentó el mayor momento hidrofóbico dentro del grupo Uy234-DR, reforzando la decisión de elegirla para su síntesis. La fórmula utilizada para calcular el número total de variantes en este grupo de péptidos fue:

$$(V_{R3,1} \cdot V_{R3,1} \cdot V_{R2,1}) = 18$$

VR_{3,1} corresponde a L4, la segunda VR_{3,1} corresponde a L5 y VR_{2,1} corresponde a A12.

La adición de ácido aspártico incrementó sustancialmente el momento dipolar del Uy234 (Tabla 9). Este efecto puede atribuirse a la presencia del grupo carboxilo del Asp, posicionado en proximidad a los grupos amino cargados positivamente de los residuos de arginina y lisina. Esta disposición podría favorecer una mayor separación espacial de cargas opuestas, lo que a su vez contribuye al aumento del dipolo del péptido. Similar a lo observado con las variantes RT, las variantes DR con triptófano muestran relación en el incremento del momento hidrofóbico con el aumento de la rigidez intrínseca (Figura 11).

Al comparar todas las variantes, tanto Uy234-A como Uy234-RT8 muestran la energía libre de transferencia más negativa hacia la fase lipídica (Tabla 9) en comparación con el péptido original Uy234. Sin embargo, solo la variante sin prolina presenta una mayor afinidad por la membrana, según los valores de GRAVY. En cuanto a la flexibilidad, todas las variantes resultaron ser más rígidas, a excepción de Uy234-R7, la cual también es la única que experimentó una disminución en su momento dipolar. Según la teoría que sustenta este trabajo, esta variante sería la que presentaría una menor actividad, solo superada por Uy234-A, a menos que la carga neta desempeñe un papel más determinante. La comprobación o rechazo de esta hipótesis será evaluada en etapas posteriores del presente estudio.

Tabla 8. Secuencias obtenidas del cuarto análisis combinatorio. En azul se encuentra la secuencia de Uy234. La variante en color amarillo representa a la variante elegida derivada del análisis. Los aminoácidos en color rojo indican aquellas posiciones substituidas.

Variante	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR1	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR2	F	P	F	L	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR3	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR4	F	P	F	L	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR5	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR6	F	P	F	I	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR7	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR8	F	P	F	I	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR9	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR10	F	P	F	L	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR11	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR12	F	P	F	V	L	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR13	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR14	F	P	F	I	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR15	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR16	F	P	F	V	I	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR17	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R
Uy234-DR18	F	P	F	V	V	S	L	I	P	S	W	I	S	A	I	K	R	L	I	D	R

Tabla 9. Características fisicoquímicas de las variantes presentadas en la Tabla 8. La variante en color amarillo representa a la variante elegida para síntesis química, derivada del análisis. La fila en negritas contiene los datos de Uy234.

Variante	H	μ H	NCZ	θ (°)	mBf	μ (D)	φ (kJ/mol)	GRAVY	WW-index (kcal/mol)
Uy234	0.873	0.467	(+1/+2)	84	1.793	162	1.234 E4	1.327	-2.00
Uy234-DR1	0.750	0.521	(+1/+2)	81	1.818	208	1.766 E4	0.971	-0.27
Uy234-DR2	0.842	0.589	(+1/+2)	81	1.795	197	1.510 E4	0.842	-2.29
Uy234-DR3	0.754	0.523	(+1/+2)	77	1.810	196	1.660 E4	1.004	-0.01
Uy234-DR4	0.847	0.590	(+1/+2)	81	1.788	199	1.770 E4	0.876	-2.04
Uy234-DR5	0.754	0.526	(+1/+2)	81	1.814	203	1.627 E4	1.004	-0.01
Uy234-DR6	0.847	0.593	(+1/+2)	81	1.792	197	1.478 E4	0.876	-2.04
Uy234-DR7	0.759	0.527	(+1/+2)	77	1.806	195	1.566 E4	1.038	0.23
Uy234-DR8	0.851	0.594	(+1/+2)	81	1.784	192	1.597 E4	0.909	-1.79
Uy234-DR9	0.727	0.515	(+1/+2)	71	1.813	206	1.642 E4	0.990	0.36
Uy234-DR10	0.819	0.585	(+1/+2)	75	1.791	197	1.893 E4	0.861	-1.66
Uy234-DR11	0.727	0.501	(+1/+2)	76	1.821	206	1.477 E4	0.990	0.36
Uy234-DR12	0.819	0.567	(+1/+2)	76	1.798	204	1.443 E4	0.861	-1.66
Uy234-DR13	0.704	0.495	(+1/+2)	71	1.816	207	1.833 E4	1.023	0.61
Uy234-DR14	0.796	0.564	(+1/+2)	75	1.793	195	1.500 E4	0.895	-1.41
Uy234-DR15	0.731	0.520	(+1/+2)	76	1.809	195	1.458 E4	1.023	0.61
Uy234-DR16	0.824	0.590	(+1/+2)	76	1.787	201	1.696 E4	0.895	-1.41
Uy234-DR17	0.731	0.502	(+1/+2)	70	1.813	202	1.747 E4	1.009	0.99
Uy234-DR18	0.824	0.568	(+1/+2)	74	1.790	197	1.876 E4	0.880	-1.03

Uy234-DR

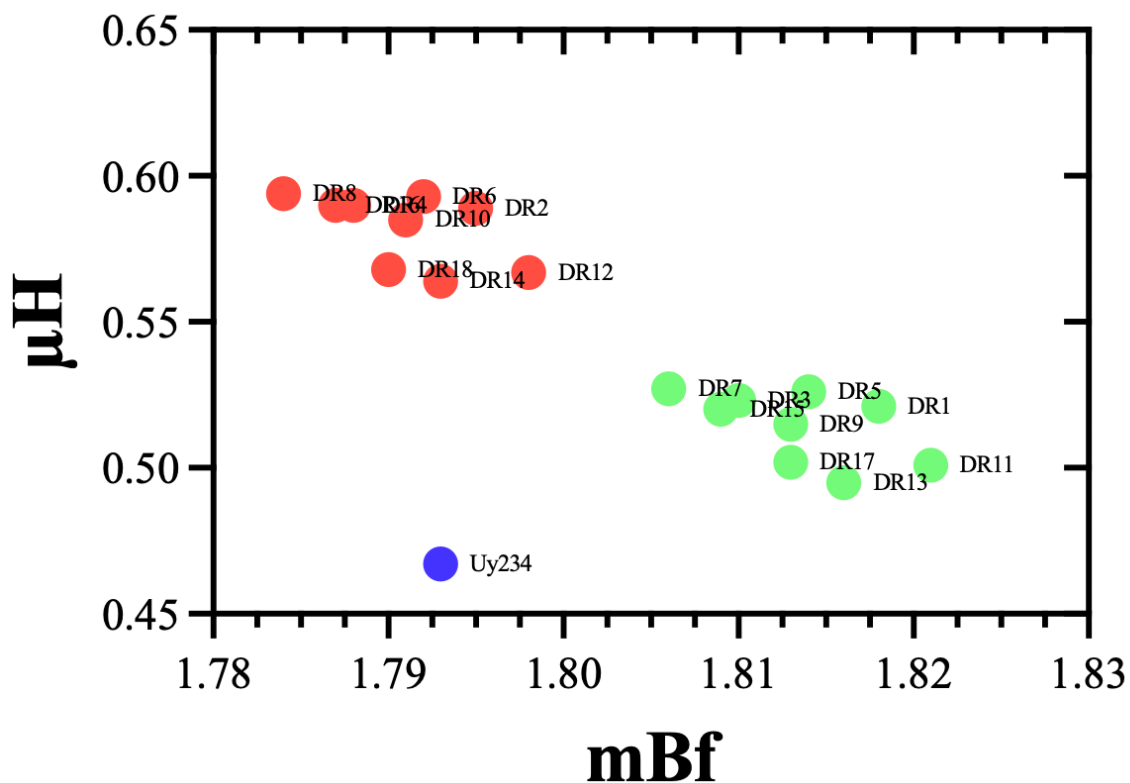


Figura 11. Flexibilidad intrínseca (mBf) contra momento hidrofóbico (μH) de las variantes -DR representadas con esferas de color y nombre. La variante en esfera color azul representa al Uy234. Las variantes en color verde representan a las variantes sin Triptófano. Las variantes en color rojo representan a las variantes con Triptófano. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 10.0 para Mac para realizar los gráficos.

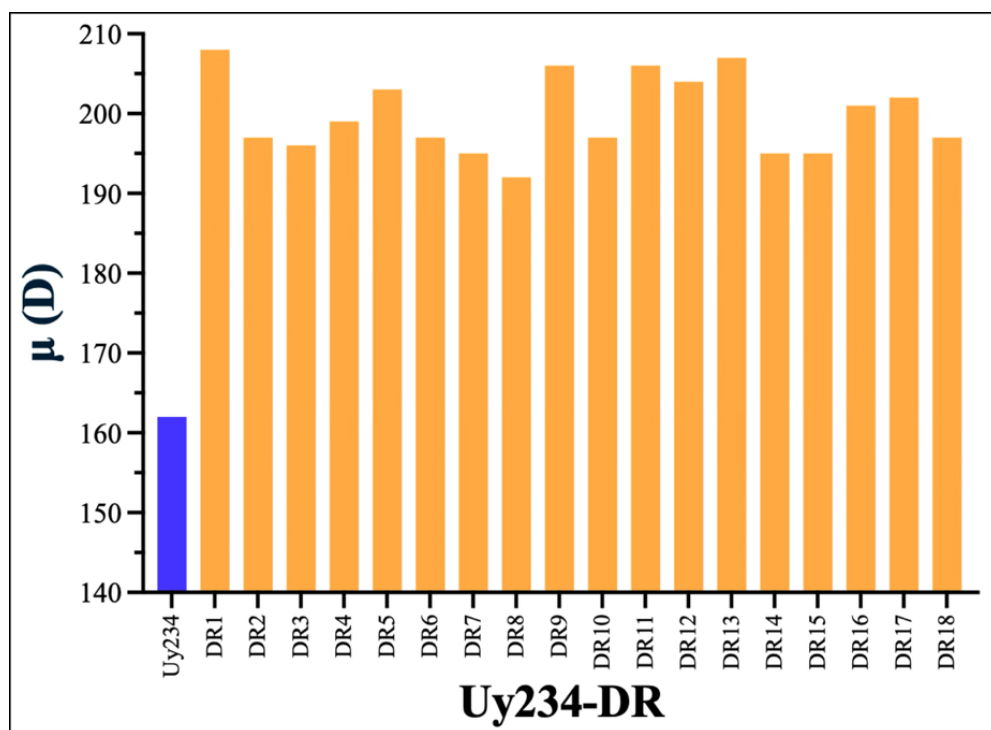


Figura 12. Momento dipolar, $\mu(D)$ de las variantes -DR. La barra en color azul representa al péptido Uy234. Las barras en color naranja representan a las variantes-DR. GraphPad Prism versión 10.0 para Mac fue utilizado para realizar los gráficos.

Tabla 10. Características fisicoquímicas de todas las variantes seleccionadas. Las variantes se encuentran en fondo amarillo. La fila en negritas y fondo blanco contiene los datos de Uy234.

Variante	H	μH	NCZ	θ (°)	mBf	μ (D)	ϕ (kJ/mol)	GRAVY	WW-index (kcal/mol)
Uy234	0.873	0.467	(+1/+2)	84	1.793	162	1.234 E4	1.327	-2.00
Uy234-A	0.851	0.480	(+1/+2)	40	1.673	178	1.236 E4	1.517	-2.28
Uy234-R7	0.811	0.489	(+1/+3)	82	1.888	127	1.168 E4	1.055	-0.86
Uy234-RT8	0.900	0.576	(+1/+3)	83	1.754	170	1.790 E4	1.042	-2.88
Uy234-DR8	0.851	0.594	(+1/+2)	81	1.784	192	1.597 E4	0.909	-1.79

La eliminación de la prolina central suprime la actividad antimicrobiana

La CMI permitió obtener resultados más concluyentes sobre la actividad antimicrobiana de las variantes del Uy234. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostró una mayor susceptibilidad frente al Uy234 en comparación con sus variantes (Tabla 11). La actividad previamente reportada para Uy234 contra *S. aureus* es de 6.25 μM (Salazar-Hernández et al., 2024), valor que coincide con lo observado en este estudio. Un hallazgo relevante es que la

sustitución de la prolina central, por una alanina, abolió la actividad antimicrobiana, lo que demuestra que su presencia es esencial para dicha actividad. La prolina ha sido descrita como un aminoácido que induce torsiones en la α -hélice, actuando como un residuo disruptor de hélices que contribuye con la reconfiguración de la estructura secundaria del péptido (Bera et al., 2015; Balleza, 2025). Este efecto también se observó en los modelos estructurales del Uy234 (Salazar-Hernández et al., 2024). En términos de relación estructura-actividad, se ha reportado previamente que la sustitución de la prolina central en la Gaegurina, un AMP aislado de la piel de la rana rugosa coreana, provocó una disminución en su actividad antimicrobiana (Suh et al., 1999), lo que apoya lo observado en el presente estudio.

Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del péptido Uy234 y sus variantes.

Bacteria	Péptido	(CMI) \pm desviación estándar (μ M)	(CMB) \pm desviación estándar μ M
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Uy234	6.25 \pm 3.77	6.25 \pm 1.28
	Uy234-A	> 100	> 100
	Uy234-R7	25 \pm 0	50 \pm 28.86
	Uy234-RT8	50 \pm 38.18	100 \pm 28.18
	Uy234-DR8	50 \pm 28.86	100 \pm 0

Uy234-R7 mostró la mayor actividad antimicrobiana entre las variantes analizadas, siendo la única que no presentaba un giro adicional de hélice en su extremo C-terminal, a diferencia de Uy234-RT8 y Uy234-DR8. Esto indica que el alargamiento de secuencia realizado no favoreció la actividad. En la Figura 13 se observa con mayor claridad la relación entre la actividad de Uy234-R7 y la concentración, donde la OD600 resulta inversamente proporcional al incremento en la concentración del péptido. Como se muestra en la Figura 14, Uy234-R7 es la variante con mayor actividad bactericida, lo que correlaciona con su buena actividad antimicrobiana. La disminución observada en la actividad respecto al Uy234 podría atribuirse a un aumento en la rigidez estructural, entre otros factores que deberán analizarse con mayor profundidad. Además, será útil complementar estos futuros resultados con estudios de modelado estructural y simulaciones de dinámica molecular para establecer conclusiones más sólidas.

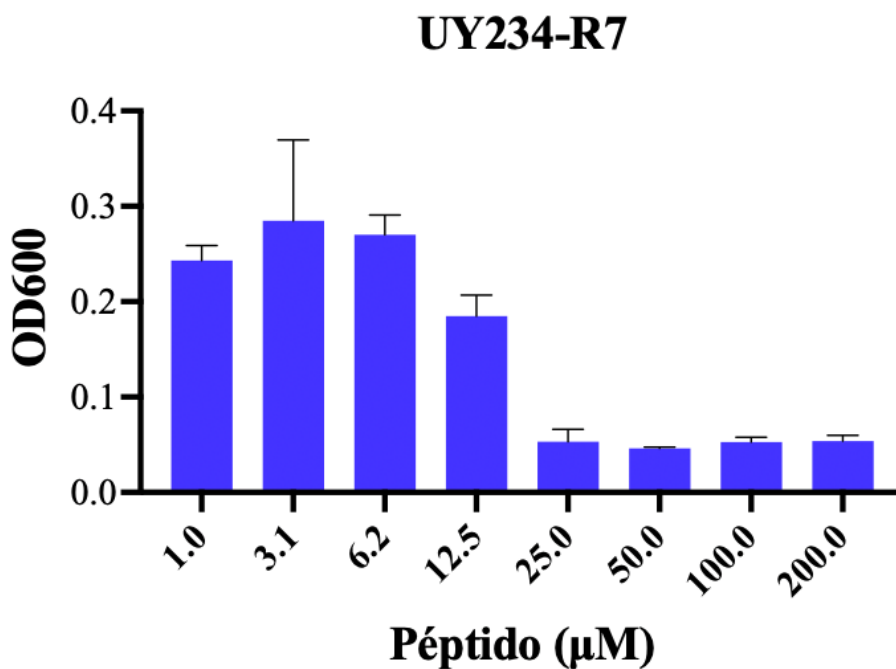


Figura 13. Actividad antimicrobiana del péptido Uy234-R7. Densidad óptica del crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 25923 a las 16 horas de cultivo y en presencia de distintas concentraciones del péptido Uy234-R7. GraphPad Prism versión 10.0 para Mac fue utilizado para realizar los gráficos.

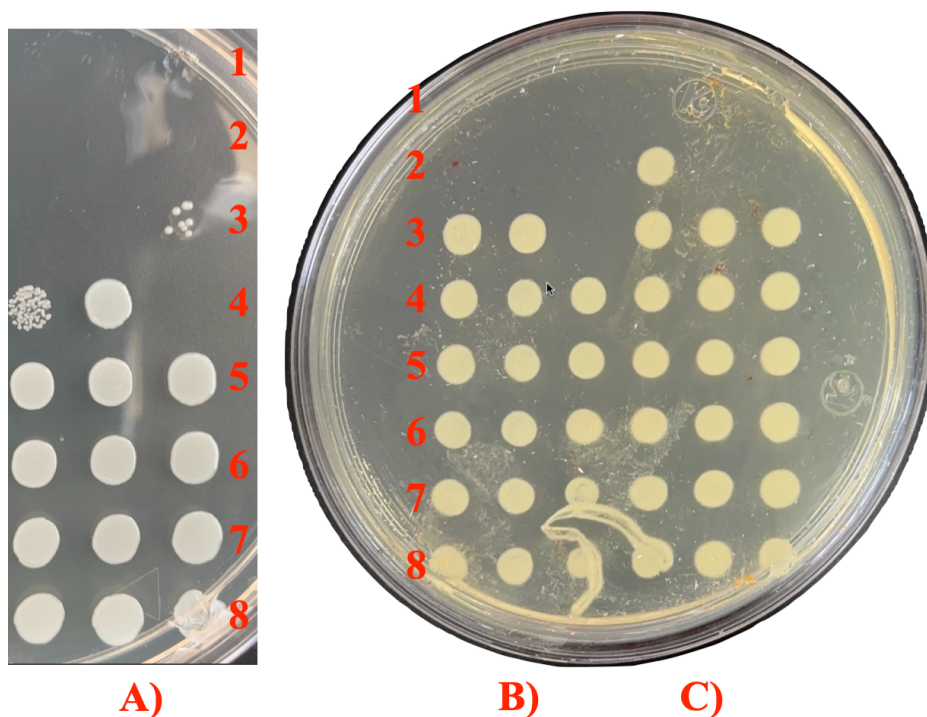


Figura 14. Actividad bactericida de **A)** Uy234-R7; **B)** Uy234-RT8; **C)** Uy234-DR8 contra *S. aureus* ATCC 25923. El ensayo fue realizado por triplicado, a distintas concentraciones de cada péptido: **1)** 200 μM; **2)** 100 μM; **3)** 50 μM; **4)** 25 μM; **5)** 12.5 μM; **6)** 6.25 μM; **7)** 3.12 μM; **8)** 1.56 μM. Las concentraciones en las que se observó crecimiento bacteriano indican que el péptido no ejerció actividad bactericida frente a la bacteria *S. aureus*.

Uy234-DR8 posee actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* AE12

La variante Uy234-DR8 presentó actividad antimicrobiana en los ensayos de difusión directa en agar contra *A. baumannii* AE12 (Figura 14), en contraste con el resultado reportado en un trabajo previo, en el cual el péptido Uy234 no mostró actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* en agar LB, incluso a concentraciones más altas (503.67 μM) (Salazar-Hernández et al., 2024), sin embargo, en dicho reporte se utilizó un método distinto de evaluación: difusión en pozo. Por lo anterior, posteriormente, el péptido Uy234 fue evaluado en un ensayo de difusión directa, presentando actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* AE12, pero no mayor que la que ejerce la variante Uy234-DR8. Este primer ensayo de actividad antimicrobiana nos permite concluir que las modificaciones realizadas generaron un efecto antimicrobiano en *A. baumannii* utilizando la variante Uy234-DR8. La cuantificación de la actividad antimicrobiana será evaluada en otro estudio.

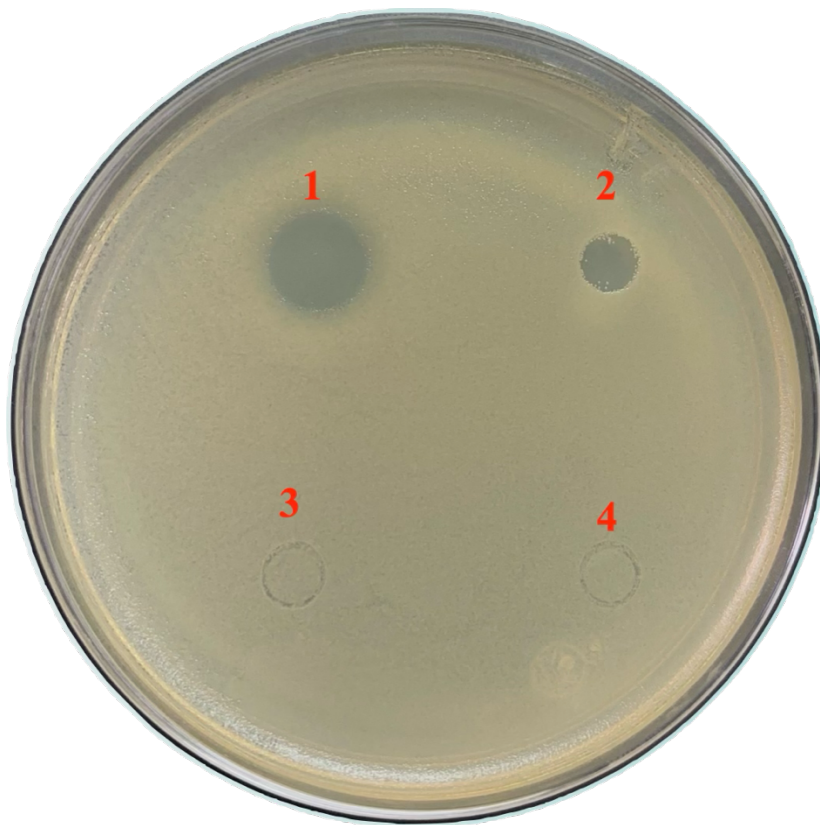


Figura 15. Actividad antimicrobiana del péptido Uy234-DR8 contra *A. baumannii* AE12, mediante el ensayo de difusión en agar., **1) control positivo:** amikacina 30 $\mu\text{g/mL}$; **2) péptido** Uy234-DR8 (317.13 μM); **3) control negativo:** agua tetradestilada; **4) control negativo:** acetoneitrilo 15%.

Las variantes de Uy234 presentan baja actividad hemolítica

El diseño de péptidos antimicrobianos con potencial uso en humanos implica el que posean una excelente actividad antimicrobiana pero una baja toxicidad a células humanas, por lo cual una actividad que se evalúa es la actividad hemolítica de los péptidos optimizados. Para lo cual se utilizaron eritrocitos de un donador sano de sangre tipo O Rh negativo con un recuento eritrocitario de $5.25 \times 10^6/\mu\text{L}$ y una concentración de hemoglobina de 14.5 g/dL, ambos dentro de los valores de referencia establecidos para humanos. Los valores fueron normalizados utilizando solución salina fisiológica (0% de hemólisis) y SDS al 10% (100%), y se graficaron junto con la actividad hemolítica de las variantes (Figura 14). Únicamente Uy234-R7 mostró un leve incremento en la actividad hemolítica (9.73 % a 50 μM), lo cual respalda lo reportado en la literatura: el aumento en la carga neta puede estar asociado con una mayor citotoxicidad hacia células humanas (Fong-Coronado et al., 2024), sin embargo, este porcentaje de hemólisis no es alto, en comparación de lo reportado para otros péptidos. La variante Uy234-A presentó una menor actividad hemolítica en comparación con Uy234, lo cual es consistente con su baja actividad antimicrobiana. Por otro lado, Uy234-DR8 mostró una menor actividad hemolítica comparado con la presentada por el péptido Uy234-RT8, lo que confirma nuevamente la influencia de la carga neta en la toxicidad celular hacia células de mamíferos.

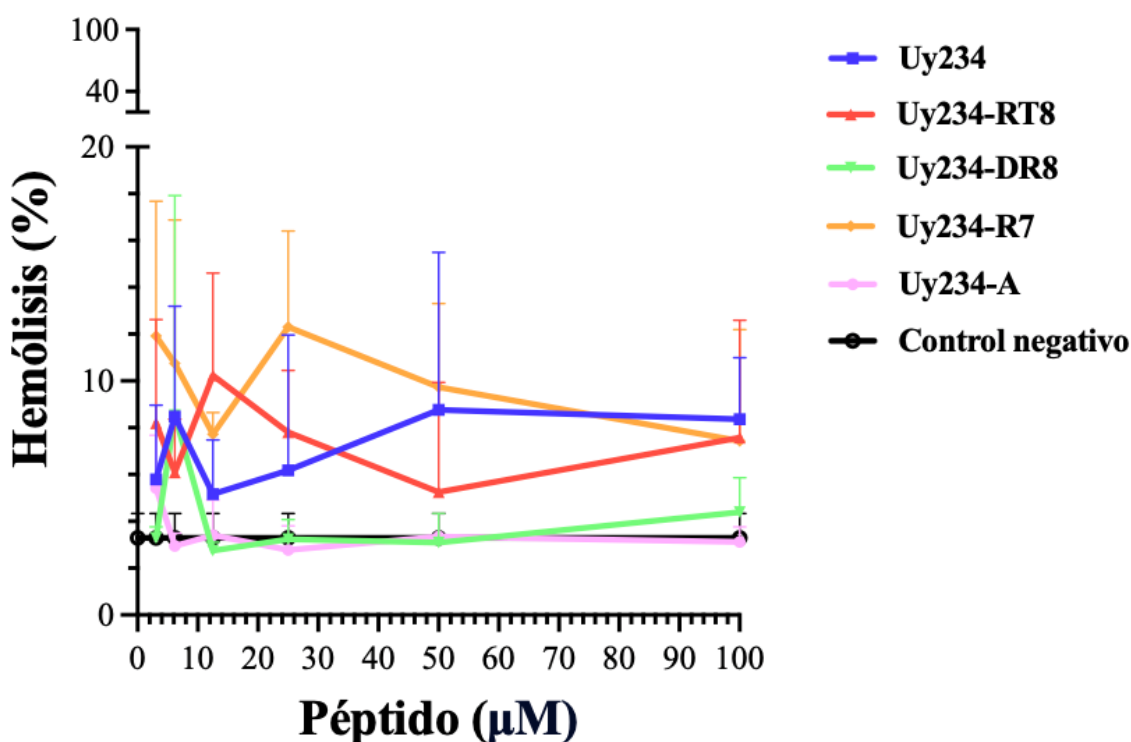


Figura 16. Porcentaje hemólisis de eritrocitos humanos ejercido por el péptido Uy234 y sus variantes, a distintas concentraciones. GraphPad Prism versión 10.0 para Mac fue utilizado para realizar los gráficos.

CONCLUSIONES

En la presente tesis se diseñaron *in silico* múltiples combinaciones de variantes peptídicas derivadas de la secuencia del péptido Uy234, y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas con el objetivo de seleccionar aquellas variantes con propiedades mejoradas relacionadas con la actividad antimicrobiana.

La adición de triptófano en el centro de la secuencia incrementó tanto el momento hidrofóbico como la rigidez de las variantes de Uy234, mientras que la incorporación de un residuo de ácido aspártico en el extremo C-terminal aumentó su momento dipolar. Conforme a nuestra hipótesis, ambas modificaciones favorecen la mejora de su actividad antibacteriana.

De las variantes sintetizadas químicamente, la variante Uy234-R7 mostró la mejor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* entre las cuatro variantes evaluadas (Uy234-A, Uy234-R7, Uy234-RT8 y Uy234-DR8), resultado que podría estar relacionado con el hecho de que fue la única, además de Uy234-A, que no aumentó su longitud.

Uy234-A perdió su actividad citotóxica contra *S. aureus*, lo que respalda la hipótesis de que la prolina es esencial para su función lítica, ya que con este cambio se demostró que la prolina desempeña un papel fundamental en la actividad del péptido Uy234, ya que su sustitución se tradujo en una pérdida de la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Desde el punto de vista químico, la prolina aporta flexibilidad al péptido, la cual se ve considerablemente comprometida en su ausencia.

Por otro lado, de manera muy relevante la variante Uy234-DR8 presentó mayor actividad antimicrobiana contra *A. baumannii*, presentando un halo de inhibición más definido, a diferencia del péptido parental.

Finalmente, la actividad hemolítica no se incrementó de forma considerable en ninguna de las variantes del péptido Uy234. Uy234-R7 presentó ligeramente una mayor actividad hemolítica, mientras que Uy234-A mostró la menor, en correlación con su actividad citotóxica frente a *S. aureus*.

La obtención de la variante Uy234-DR8, diseñada *in silico* para ejercer mayor actividad antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii*, una de las bacterias incluidas en el grupo de prioridad crítica para los cuales se requiere el desarrollo de nuevos antimicrobianos, representa un gran logro que nos permitirá continuar en su caracterización, optimización y avanzar en el camino para la obtención de antimicrobianos de última generación.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El experimento relacionado con la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Asmari, A. K., Alamri, M. A., Almasoudi, A. S., Abbasmanthiri, R., & Mahfoud, M. (2017). Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of selected Saudi scorpion venoms tested against multidrug-resistant micro-organisms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *10*(17), 14–18.
- Almaaytah, A., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Walker, B., & Shaw, C. (2012). Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. *Peptides*, *35*(2), 291–299.
- 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*.
- Andrews, J. M. (2006). BSAC standardized disc susceptibility testing method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(3), 511–529.
- Balleza, D. (2023). Peptide Flexibility and the Hydrophobic Moment are Determinants to Evaluate the Clinical Potential of Magainins. *Journal of Membrane Biology*.
- Balleza, D. (2025). The Role of Flexibility in the Bioactivity of Short α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antibiotics*, *14*(5), 422.
- Bera, S., Ghosh, A., Sharma, S., Debnath, T., Giri, B., & Bhunia, A. (2015). Probing the role of Proline in the antimicrobial activity and lipopolysaccharide binding of indolicidin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *452*, 148–159.
- Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial peptides: An update on classifications and databases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21).
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238–250.
- Carey, A. B., Ashenden, A., & Köper, I. (2022). Model architectures for bacterial membranes. In *Biophysical Reviews* (Vol. 14, Issue 1). Springer Berlin Heidelberg.
- Cesa-Luna, C., Muñoz-Rojas, J., Saab-Rincon, G., Baez, A., Morales-García, Y. E., Juárez-González, V. R., & Quintero-Hernández, V. (2019). Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *PLoS ONE*, *14*(11), 1–19.
- Chakraborty, S., Chatterjee, R., & Chakravorty, D. (2022). Evolving and assembling to pierce through: Evolutionary and structural aspects of antimicrobial peptides. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *20*, 2247–2258.
- Chang-Ro, L., Hun Lee, J., Moonhee, P., Kwang Seung, P., Il Kwon, B., Young Bae, K., Chang-Jun, C., Byeong Chul, J., & Sang Hee, L. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(55), 1–35.
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(4), 1398–1406.

- Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T. S., Chinedu Ikem, J., Victor Chigozie, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9).
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40.
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters*, 471(2–3), 165–168.
- Cooper, G. (2019). *The Cell A Molecular Approach* (8th ed.).
- De Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Schembri, M., Beatson, S., Paterson, D., & Walker, M. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 1–49.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, 299(5881), 371–374.
- Fauchère, J.-L., & Pliska, V. (1983). Hydrophobic parameters II of amino acid side-chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 18(4), 369–375.
- Felder, C. E., Prilusky, J., Silman, I., & Sussman, J. L. (2007). A server and database for dipole moments of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, 512–521.
- Feurstein, C., Meyer, V., & Jung, S. (2022). Structure–Activity Predictions From Computational Mining of Protein Databases to Assist Modular Design of Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology*, 13(April).
- Fong-Coronado, P. A., Ramirez, V., Quintero-Hernández, 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. *The Journal of Membrane Biology*.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, 14(3), e0209865.
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. D. R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *Gaceta Médica de México*, 156, 171–178.
- Gottler, L., & Ramamoorthy, A. (2009). Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan – A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed From Magainin. *Biochim Biophys Acta*, 61(6), 515–525.
- Grau-Campistany, A., Strandberg, E., Wadhvani, P., Reichert, J., Bürck, J., Rabanal, F., & Ulrich, A. S. (2015). Hydrophobic mismatch demonstrated for membranolytic peptides, and their use as molecular rulers to measure bilayer thickness in native cells. *Scientific Reports*, 5.
- Gregory, S. M., Pokorny, A., & Almeida, P. F. F. (2009). Magainin 2 revisited: a test of the quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles. *Biophysical Journal*, 96(1), 116–131.

- Guglielmelli, A., Bartucci, R., Rizzuti, B., Palermo, G., Guzzi, R., & Strangi, G. (2023). The interaction of tryptophan enantiomers with model membranes is modulated by polar head type and physical state of phospholipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 224.
- Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, 88, 115–137.
- Humpola, M. V., Spinelli, R., Erben, M., Perdomo, V., Tonarelli, G. G., Albericio, F., & Siano, A. S. (2023). D- and N-Methyl Amino Acids for Modulating the Therapeutic Properties of Antimicrobial Peptides and Lipopeptides. *Antibiotics*, 12(5).
- Ibarra-Valencia, M. A., Espino-Solis, G. P., Estrada, B. E., & Corzo, G. (2021). Immunomodulatory responses of two synthetic peptides against salmonella typhimurium infection. *Molecules*, 26(18).
- Jiang, J. H., Hassan, K. A., Begg, S. L., Rupasinghe, T. W. T., Naidu, V., Pederick, V. G., Khorvash, M., Whittall, J. J., Paton, J. C., Paulsen, I. T., McDevitt, C. A., Peleg, A. Y., & Eijkelkamp, B. A. (2019). Identification of novel acinetobacter baumannii host fatty acid stress adaptation strategies. *MBio*, 10(1), 1–6.
- Jiang, X., Yang, K., Yuan, B., Han, M., Zhu, Y., Roberts, K. D., Patil, N. A., Li, J., Gong, B., Hancock, R. E. W., Velkov, T., Schreiber, F., Wang, L., & Li, J. (2020). Molecular dynamics simulations informed by membrane lipidomics reveal the structure-interaction relationship of polymyxins with the lipid A-based outer membrane of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3534–3543.
- Jurus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128.
- Kabelka, I., & Vácha, R. (2021). Advances in Molecular Understanding of α -Helical Membrane-Active Peptides. *Accounts of Chemical Research*, 54(9), 2196–2204.
- Kamischke, C., Fan, J., Bergeron, J., Kulasekara, H. D., Dalebroux, Z. D., Burrell, A., Kollman, J. M., & Miller, S. I. (2019). The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane. *ELife*, 1–25.
- Karaiskos, I., Lagou, S., Pontikis, K., Rapti, V., & Poulakou, G. (2019). The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Frontiers in Public Health*, 7(JUN), 1–25.
- Koller, D., & Lohner, K. (2014). The role of spontaneous lipid curvature in the interaction of interfacially active peptides with membranes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1838, Issue 9, pp. 2250–2259). Elsevier.
- Koprivnjak, T., Zhang, D., Ernst, C. M., Pesche, A., Nauseef, W. M., & Weiss, J. P. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* cardiolipin synthases 1 and 2 and their Contribution to accumulation of cardiolipin in stationary phase and within phagocytes. *Journal of Bacteriology*, 193(16), 4134–4142.
- Kowalska-Baron, A., Gałęcki, K., & Wysocki, S. (2015). Room temperature phosphorescence study on the structural flexibility of single tryptophan containing proteins. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 380–387.

- 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).
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105–132.
- Li, Z., Xu, X., Meng, L., Zhang, Q., Cao, L., Li, W., Wu, Y., & Cao, Z. (2014). Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. *PLoS ONE*, 9(5).
- Li, Z., Yuan, Y., Li, S., Deng, B., & Wang, Y. (2020). Antibacterial activity of a scorpion-derived peptide and its derivatives in vitro and in vivo. *Toxicon*, 186(August), 35–41.
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961), 46–50.
- Liu, L., Fang, Y., & Wu, J. (2013). Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2479–2486.
- Lopalco, P., Stahl, J., Annesse, C., Averhoff, B., & Corcelli, A. (2017). Identification of unique cardiolipin and monolysocardiolipin species in *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Juárez-González, V. R., & Possani, L. D. (2015). Whole transcriptome of the venom gland from *urodacus yaschenkoii* scorpion. *PLoS ONE*, 10(5), 1–33.
- Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C. V. F., Winkel, K. D., & Possani, L. D. (2013). Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoii*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon*, 63(1), 44–54.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., & Falagas, M. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., Baez, A., & Quintero-Hernandez, V. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. In *Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora en México* (1st ed.).
- Norman, K. E., & Nymeyer, H. (2006). Indole localization in lipid membranes revealed by molecular simulation. *Biophysical Journal*, 91(6), 2046–2054.
- Porooshat, D. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910.
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103.
- Quintero, V. (2021). La próxima pandemia: Bacterias multirresistentes a antibióticos. *AyTBUAP*, 6(21), 1–7.
- Ryan, K. (2018). Antibacterial agents and Resistance. In *Sherris Medical Microbiology* (pp. 431–458).
- Salazar-Hernández, D., Juárez-González, V. R., Bustamante, V. H., Martínez-Martínez, L. L., Ramírez, V., Balleza, D., & Quintero-Hernández, V. (2024).

- Conformational Flexibility and Net Charge are Key Determinants for the Antimicrobial Activity of Peptide Uy234 Against Multidrug-resistant Bacteria. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 30(6), 79.
- Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 63–73.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133–159.
- Suh, J. Y., Lee, Y. T., Park, C. B., Lee, K. H., Kim, S. C., & Choi, B. S. (1999). Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 665–674.
- Sulis, G., Sayood, S., & Gandra, S. (2022). Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 20(2), 147–160.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.
- Takechi-Haraya, Y., Ohgita, T., Kotani, M., Kono, H., Saito, C., Tamagaki-Asahina, H., Nishitsuji, K., Uchimura, K., Sato, T., Kawano, R., Sakai-Kato, K., Izutsu, K. ichi, & Saito, H. (2022). Effect of hydrophobic moment on membrane interaction and cell penetration of apolipoprotein E-derived arginine-rich amphipathic α -helical peptides. *Scientific Reports*, 12(1). h
- Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547–3567.
- Vishnepolsky, B., & Pirtskhalava, M. (2014). Prediction of linear cationic antimicrobial peptides based on characteristics responsible for their interaction with the membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(5), 1512–1523.
- Wimley, W., & White, S. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(10), 842–848.