



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO COMPOSICIONAL Y ESTRUCTURAL DE LA PANTININA 2
PRESENTE DE *Pandinus imperator* Y SU POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE: LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

GONZÁLEZ MUÑOZ ANDREA GRISSEL

ASESORES DE TESIS

ASESOR:

D. C. Daniel Balleza Mejía

CO-ASESOR:

D. C. Verónica Liliana Ramírez Falcon

12 DE MARZO DE 2026

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, quienes han sido el pilar fundamental a lo largo de mi formación universitaria. Gracias por brindarme su apoyo incondicional, su paciencia infinita y por acompañarme en cada paso de este camino.

A mi madre, especialmente, porque es mi motor, mi fuerza y mi valentía para seguir adelante. Gracias por creer en mí, por darme las herramientas necesarias para construir mi futuro, y por sostenerme con amor en cada desafío.

A mi hermana, mis hermanos y mis sobrinas, por ser mi refugio, mi alegría y mi hogar, su presencia y cariño han sido una motivación constante para no rendirme.

A la Doctora Verónica, mi profesora, mi guía y también mi amiga, agradezco profundamente la oportunidad de formar parte de este trabajo. Gracias por acompañarme no solo académicamente, sino también en lo personal, durante toda mi estancia universitaria. Su confianza y dedicación marcaron una diferencia inmensa en mi formación.

Al Doctor Daniel, por su paciencia, su tiempo y el esfuerzo entregado para que yo comprendiera cada uno de los nuevos conceptos y retos que se me presentaron. Gracias a ambos, este proyecto pudo hacerse realidad.

A Gustavo, gracias por confiar en mí incluso en los momentos en los que yo misma no podía hacerlo, tus palabras y tu apoyo en mi camino fueron un recordatorio constante de que sí era capaz y la ayuda que me brindaste para que pudiera continuar con este proyecto significaron más de lo que puedo expresar.

A mis amigos, gracias por compartir conmigo risas, desvelos, cansancio y también esperanza. Su compañía hizo este proceso mucho más ligero y significativo.

A mi perro Manchas, que estuvo conmigo en cada noche larga, acompañándome en silencio, haciéndome sentir que nunca estaba sola. Su compañía fue un pequeño consuelo que siempre llegó a tiempo.

Y finalmente, agradezco a Dios, por poner en mi vida a las personas correctas en el momento exacto, y por permitirme llegar hasta aquí con salud, fuerza y esperanza.



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



OFICIO C.Q./CT 068 RPCR/2025

OFICIO DE REGISTRO Y NOMBRAMIENTO DE COMISION REVISORA

Nombre del(la) estudiante: **Andrea Grissel González Muñoz**

Matrícula: **202038831**

Nombre del director: **D.C Daniel Balleza Mejía**

Nombre del codirector o asesor: **D.C Verónica Liliana Ramírez Falcón**

Título de la Tesis:

"Estudio composicional y estructural de la Pantinina 2 presente de Pandinus imperator y su potencial farmacológico "

Comisión Revisora:

Presidente: M.E.C Obdulia Vera López

Firma: _____

Secretario: M.C Armando Cortes Lozada

Firma: _____

Vocal: D.C Addi Rhode Navarro Cruz

Firma: _____

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 07 de octubre de 2025

Dr. Henoc Flores Segura

Director Facultad de Ciencias Químicas

c.c.p. Archivo





**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



OFICIO C.Q./CT 010 A/2026

Dr. Henoc Flores Segura
Director Facultad de Ciencias Químicas
Presente.

OFICIO DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Título de la Tesis:

“Estudio composicional y estructural de la Pantinina 2 presente de Pandinus imperator y su potencial farmacológico”

Comisión Revisora:

Presidente: M.E.C. Obdulia Vera López

Firma: _____

Secretario: M.C. Armando Cortes Lozada

Firma: _____

Vocal: D.C. Addi Rhode Navarro Cruz

Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora comunicamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de licenciatura de **Químico Farmacobiólogo** que presenta la estudiante **Andrea Grissel González Muñoz**, bajo la dirección del **D.C. Daniel Balleza Mejía** y codirección de **D.C. Verónica Liliana Ramírez Falcón** por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el estudiante presente su defensa y examen, con número de matrícula **202038831**.

Atentamente

Comisión revisora

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 18 de febrero de 2026

c.c.p. Archivo



Facultad de Ciencias Químicas
Av. San Claudio No. 1 Edificio FCQ 9
Ciudad Universitaria Col. San
Manuel (222)2295500 ext. 7390

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Propiedades antimicrobianas de los compuestos naturales	2
1.2 Resistencia antimicrobiana (RAM)	2
1.2.1 Líneas de defensa frente a la resistencia antimicrobiana	2
1.3 Péptidos	4
1.3.1 Péptidos antimicrobianos y su mecanismo de acción	6
1.3.2 Importancia biomédica de los péptidos antimicrobianos	8
1.4 Veneno de escorpión.....	9
1.4.1 Veneno de escorpiones con efecto antimicrobiano	10
1.5 Pantininas	11
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las pantininas aisladas del veneno de escorpión	11
1.6 Aplicaciones terapéuticas potenciales de las pantininas	12
1.7 Uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de péptidos antimicrobianos	12
2. ANTECEDENTES.....	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos específicos	19
6. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Herramientas bioinformáticas.....	21
7.2 Material biológico.....	21
7.3 Equipos.....	21
7.4 Obtención de secuencias	21
7.5 Análisis composicional	21
7.6 Análisis estructural.....	21
7.7 Cálculo de los parámetros fisicoquímicos	21
7.7.1 Índice de hidropatía GRAVY (Grand Average of Hydropathy)	21

7.7.2 Momento hidrofóbico (μH).....	21
7.7.3 Flexibilidad intrínseca (mBf)	22
7.7.4 Momento dipolar (μ).....	22
7.8. Diseño de variantes	22
7.8.1 Comparación y evaluación de variantes	22
7.8.2 Simulaciones de dinámica molecular utilizando herramientas computacionales...	22
8. METODOLOGÍA.....	23
8.1 Búsqueda de las secuencias para cada péptido	23
8.2 Comparación de las secuencias.....	23
8.3 Predicción estructural con AlphaFold2	24
8.4 Herramientas bioinformáticas para el cálculo de los parámetros fisicoquímicos	27
8.4.1 Cálculo del índice de hidropatía GRAVY	27
8.4.2 Cálculo del momento hidrofóbico con Heliquist	28
8.4.3 Cálculo de la flexibilidad intrínseca con FlexiProt.....	30
8.4.4 Cálculo del momento dipolar	32
8.5 Diseño de variantes:	33
8.5.1 Criterios generales de diseño.....	33
8.5.2 Introducción de una glicina	34
8.5.3 Mantenimiento de la anfipaticidad helicoidal	34
8.5.4 Cambios en el residuo inicial de Pantinina 2	35
8.5.5 Sustituciones en la región central.....	35
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
9.1 Variantes preliminares	36
9.2 Análisis comparativo de las variantes preliminares	38
9.3 Selección de variantes finales y análisis comparativo detallado	39
9.4 Dinámica molecular	41
9.4.1 Análisis de fluctuaciones estructurales (RMSF) mediante CABS-flex.....	42
9.4.2 Análisis de los mapas de contacto mediante CABS-flex	44
9.4.3 Análisis del potencial electrostático mediante APBS.....	46
9.4.4 Análisis estructural tridimensional mediante PyMOL	47
9.5 Análisis comparativo	49

9.5.1 De las fluctuaciones a la interacción interna.....	50
9.5.2 Del reforzamiento estructural al paisaje electrostático.....	50
9.5.3 De la electrostática a la estructura tridimensional	50
10. CONCLUSIÓN.....	52
11. REFERENCIAS	53
12. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	58
13. APÉNDICES	59
Apéndice A. Índice GRAVY	59
Apéndice B. Momento hidrofóbico	60
Apéndice C. Flexibilidad intrínseca	61
Apéndice D. Factor B	62
Apéndice E. Momento dipolar	63

RESUMEN

Las pantininas son péptidos antimicrobianos (AMPs) presentes en el veneno del escorpión *Pandinus imperator* y destacan por su capacidad para interactuar con membranas bacterianas, lo que les confiere un potencial farmacológico relevante. Estas biomoléculas poseen propiedades fisicoquímicas y estructurales particulares que determinan su actividad antimicrobiana. En especial, la Pantinina 2 ha mostrado una organización estructural y una hidrofobicidad características que la convierten en un modelo atractivo para estudiar cómo pequeñas modificaciones en la secuencia pueden alterar su eficiencia biológica.

El análisis de la dinámica conformacional es fundamental para comprender cómo cambian las estructuras tridimensionales de estos péptidos a la vez que estos cambios estructurales pueden influir directamente en su capacidad para insertarse o desestabilizar membranas, un paso clave en su mecanismo de acción. En este trabajo, la evaluación de dichas dinámicas se realizó mediante simulaciones computacionales utilizando herramientas de modelado y predicción estructural, las cuales incluyen CABS-flex, APBS y PyMOL, con apoyo de parámetros biofísicos como el índice de anfipaticidad (GRAVY), el momento hidrofóbico (μH), momento dipolar (μ) y la flexibilidad intrínseca ponderada (mBf).

Con este enfoque computacional es posible observar cómo variaciones específicas en la secuencia de aminoácidos de la Pantinina 2 pueden modificar su comportamiento estructural, su organización helicoidal y su interacción potencial con la superficie de membranas bacterianas. Estos análisis brindan información valiosa para predecir tendencias en bioactividad y para comparar la Pantinina 2 con otras pantininas previamente descritas.

El entendimiento composicional y estructural de la Pantinina 2 no solo ayuda a explicar su posible mecanismo antimicrobiano, sino que también aporta bases para el diseño racional de nuevas variantes de estos péptidos con actividades optimizadas. De esta manera, el presente estudio contribuye al desarrollo de péptidos con potencial terapéutico frente a la creciente problemática de la resistencia antimicrobiana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades antimicrobianas de los compuestos naturales

Los compuestos naturales producidos por plantas, animales, hongos y microorganismos han sido y siguen siendo una fuente primordial de agentes antimicrobianos. Estas moléculas abarcan desde metabolitos secundarios (alcaloides, terpenos, fenoles) hasta péptidos y proteínas, y ejercen sus efectos por mecanismos diversos: (1) inhibición de la síntesis de pared celular; (2) bloqueo de rutas metabólicas esenciales; (3) interacción y desestabilización de membranas, y (4) modulaciones de la respuesta inmune del huésped (Stan et al., 2021; Amorim et al., 2018). La riqueza estructural de los compuestos naturales facilita así la identificación de motivos funcionales y la posterior optimización química para mejorar su potencia y reducir la toxicidad asociada, hecho que ha sido explotado tanto en farmacología como en biotecnología (Ageitos, Torres & de la Fuente-Núñez, 2022; Stan et al., 2021).

1.2 Resistencia antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana constituye una amenaza creciente para la salud pública global: reduce la eficacia terapéutica de los agentes convencionales y aumenta la morbilidad, mortalidad y costes sanitarios (CDC, 2019; Haiyang & Quiñones, 2021). La emergencia y diseminación de cepas multirresistentes se debe a múltiples factores, entre ellos el uso inapropiado de antibióticos en medicina humana y veterinaria, la transmisión nosocomial y comunitaria, y la falta de nuevos antimicrobianos de uso farmacéutico; por ello, la búsqueda de alternativas que incluyan péptidos antimicrobianos y derivados de venenos es prioritaria (De la Fuente et al., 2015; CDC, 2019).

1.2.1 Líneas de defensa frente a la resistencia antimicrobiana

Una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia de las bacterias a los agentes antimicrobianos puede orientar el uso de agentes existentes con mayor actividad y el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos más eficaces.

Las resistencias a los antimicrobianos pueden clasificarse en dos grandes grupos según los modos de resistencia adquiridos por las bacterias a los agentes antimicrobianos: (1) intrínseca y (2) adquirida (Figura 1) (Pérez-Gracia et al., 2021).

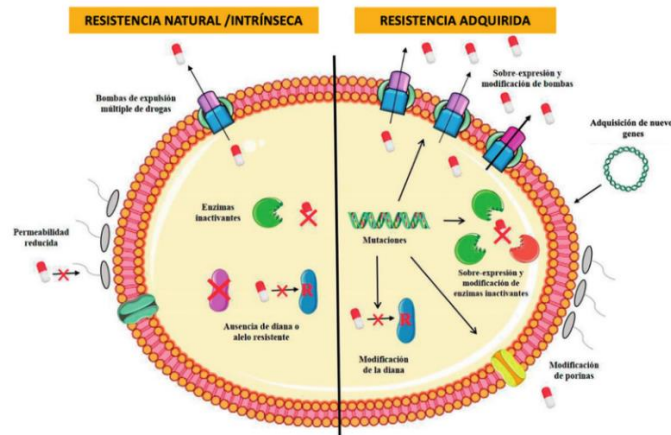


Figura 1. Principales mecanismos de resistencia natural o intrínseca y adquirida en bacteria. La resistencia intrínseca incluye permeabilidad reducida, bombas de eflujo, ausencia o modificación de la diana y enzimas inactivadoras. La resistencia adquirida comprende mutaciones en la diana, sobreexpresión de bombas o enzimas, modificación de porinas y adquisición de genes de resistencia mediante plásmidos u otros elementos móviles.

Los mecanismos generales que determinan el desarrollo de resistencias bacterianas ante agentes antimicrobianos se categorizan en tres grupos según sus sitios de acción de resistencia (Figura 2). La primera línea de defensa son las biopelículas bacterianas; la pared celular, la membrana celular y las bombas de eflujo encapsuladas constituyen la segunda línea de defensa; y, cuando los bactericidas finalmente entran en las células bacterianas, la bioquímica intracelular y las respuestas genéticas juegan un papel importante en las resistencias y se consideran como la tercera línea de defensa (Zhou et al., 2015).

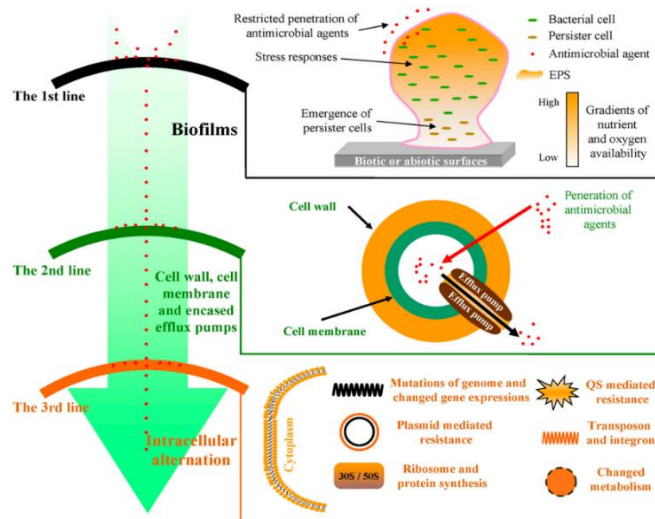


Figura 2. Diagrama simplificado que resume los mecanismos de las tres líneas de defensa de resistencia a los agentes antimicrobianos en bacterias. En la primera línea las bacterias forman biopelículas, en la segunda línea se involucra la pared celular, membrana celular, las bombas de eflujo y en la tercera línea ocurren cambios genéticos y bioquímicos internos que afectan directamente el blanco del antibiótico. (Zhou et al., 2015).

La primera línea de defensa está representada por la formación de biopelículas, estructuras multicelulares en las que microorganismos se agregan y quedan inmersos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Costerton et al., 1995). Las biopelículas constituyen un modo protegido de crecimiento que permite a las bacterias tolerar condiciones hostiles y exhibir una resistencia significativamente mayor frente a agentes antimicrobianos, resultado de mecanismos multifactoriales tales como la limitada penetración de los antimicrobianos a través de la matriz extracelular polimérica, la disminución de la tasa metabólica y del crecimiento bacteriano, la presencia de subpoblaciones celulares persistentes, la expresión diferencial de genes de resistencia y la activación de sistemas de respuesta al estrés, así como de una resistencia colectiva derivada de la organización y comunicación celular dentro de la comunidad (Drenkard et al., 2003; Hoyle, BD et al., 1991; Vega, NM et al., 2014).

La segunda línea de defensa está constituida por barreras físicas, esencialmente la pared celular, la membrana citoplasmática y los sistemas de bombas de eflujo. Cambios estructurales en la pared o la membrana pueden limitar la penetración de antimicrobianos o impedir su acumulación intracelular, mientras que las bombas de eflujo contribuyen a expulsar activamente los compuestos tóxicos, elevando así los niveles de resistencia (Zhou et al., 2015).

Finalmente, la tercera línea de defensa comprende los mecanismos intracelulares de resistencia, que entran en acción cuando los agentes antimicrobianos logran penetrar la célula bacteriana. En esta etapa, las bacterias pueden modificar los sitios diana, producir enzimas antagonistas o regular la expresión génica para neutralizar la acción antimicrobiana (Zhou et al., 2015). Estos procesos incluyen mutaciones en proteínas blanco como como las alteraciones en las proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que disminuyen la afinidad por los antibióticos β -lactámicos (Chambers, 2001), así como modificaciones en las subunidades ribosomales 30S o 50S, que confieren resistencia a aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas (Wilson, 2014). Asimismo, la inactivación de fármacos mediante enzimas, como las β -lactamasas, acetiltransferasas o fosfotransferasas, representa un mecanismo ampliamente distribuido entre bacterias patógenas (Bush & Jacoby, 2010). Adicionalmente, la reprogramación metabólica y adaptativa, junto con cambios en la expresión génica asociados a rutas de estrés celular, permite a la bacteria sobrevivir aun en presencia de concentraciones inhibitorias de antimicrobianos (Poole, 2012; Vega et al., 2012).

1.3 Péptidos

Un péptido es una cadena corta de 2 a 50 aminoácidos, formada por reacciones de condensación y unida mediante enlaces covalentes (Friedberg F et al. 1947). Sus propiedades fisicoquímicas como longitud, composición de residuos, carga neta, distribución de hidrofobicidad y capacidad para adoptar estructuras secundarias, condicionan su interacción con blancos biológicos, además de su estabilidad en condiciones fisiológicas (Lehninger; Nelson & Cox, 2017). En el contexto antimicrobiano, muchos péptidos son

catiónicos y anfipáticos, lo que favorece su afinidad por superficies microbianas ricas en lípidos aniónicos, principalmente fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilserina (PS). En bacterias Gram positivas, la membrana suele estar compuesta mayormente por PG y CL, además de la presencia de ácidos teicoicos con carga negativa; mientras que en bacterias Gram negativas, la capa externa contiene lipopolisacárido (LPS) que es altamente aniónico y la membrana interna presenta una proporción elevada de fosfatidiletanolamina (PE) junto con PG y CL (Bahar & Ren, 2013; Hancock & Sahl, 2006).

Existen 20 aminoácidos (aa) naturales (Figura 3), los cuales se pueden combinar de manera específica para generar una inmensa variedad de moléculas con diversas propiedades biológicas (Vélez et al., 2021).

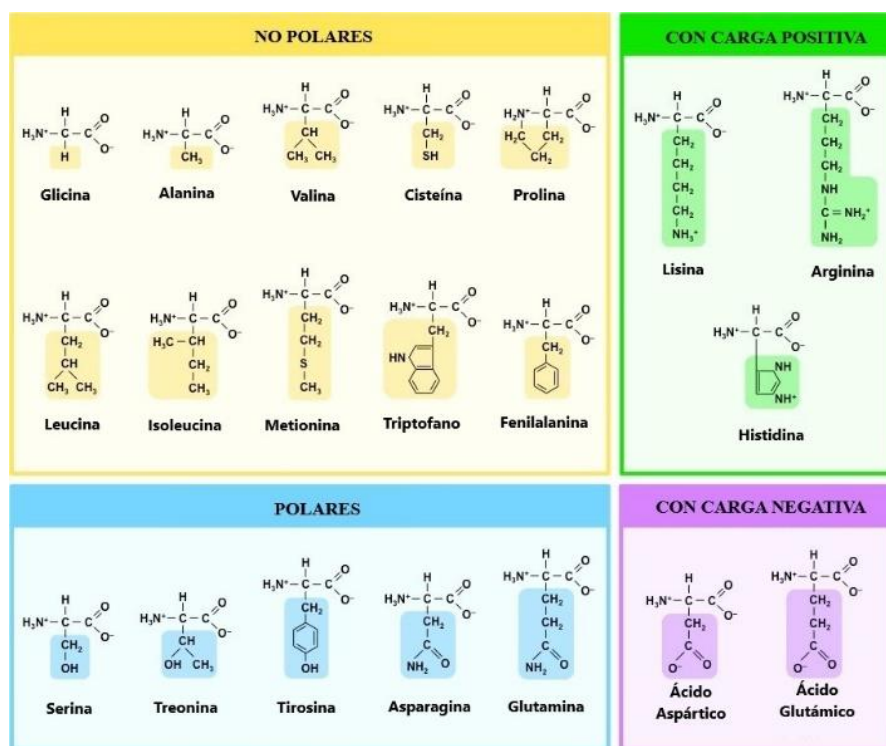


Figura 3. Tabla de aminoácidos naturales agrupados por las propiedades químicas de su grupo lateral (R).

Dependiendo de su longitud, pueden clasificarse como oligopéptidos, polipéptidos o proteínas (Figura 4). Los péptidos desempeñan funciones biológicas esenciales, incluyendo la señalización celular, la regulación enzimática y la defensa contra patógenos (Fjell et al., 2012).

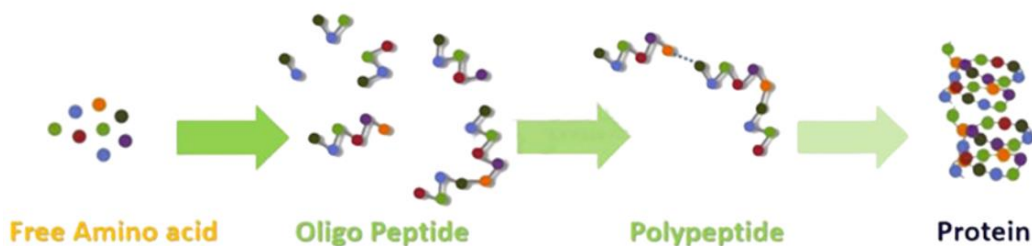


Figura 4. Relación entre aminoácido libre, oligopéptido, polipéptido y proteína.

1.3.1 Péptidos antimicrobianos y su mecanismo de acción

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son componentes clave del sistema inmunológico innato de muchos organismos, incluidas diversas especies de artrópodos. Se han identificado y caracterizado múltiples AMPs con propiedades bioactivas que los hacen candidatos potenciales para el desarrollo de nuevas terapias contra microorganismos multirresistentes (Hancock y Sahl, 2006). Un ejemplo ampliamente estudiado es la melitina, un péptido anfipático de 26 aminoácidos aislado del veneno de *Apis mellifera*, que exhibe una potente actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como actividad antifúngica y antiviral (Raghuraman & Chattopadhyay, 2007; Zasloff, 2002). Su mecanismo de acción se asocia principalmente con la interacción electrostática con la membrana bacteriana y la posterior desestabilización de la bicapa lipídica, lo que conduce a la lisis celular (Dempsey, 1990). Sin embargo, su elevada actividad hemolítica ha impulsado el diseño de análogos estructuralmente modificados con el objetivo de mejorar su selectividad y reducir su toxicidad, destacando la importancia del estudio estructural y funcional de los AMPs para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Hancock & Sahl, 2006).

La mayoría de los AMPs actúan mediante mecanismos de tipo membranolítico: formación de poros, desestabilización de la bicapa lipídica, o translocación que induce muerte celular. Las pantininas, al adoptar una α -hélice anfipática, se insertan en la membrana bacteriana y provocan su ruptura por mecanismos como los modelos “alfombra”, “poro toroidal” y “poro tipo barril” (Fig. 5 y 6) (Brogden, 2005). La eficacia de estos mecanismos está estrechamente relacionada con dos propiedades fisicoquímicas claves: la curvatura inducida por la membrana y la hidrofobicidad del péptido. Con el uso de simulaciones moleculares, se ha demostrado que péptidos más hidrofóbicos tienden a favorecer el mecanismo formación de barril, ya que pueden insertarse profundamente en la bicapa y estabilizar canales transmembranales. Por otro lado, péptidos con hidrofobicidad moderada y mayor afinidad por la interfase acuosa, inducen curvatura positiva en la membrana, fenómeno característico del modelo de alfombra y los poros toroidales, donde la acumulación superficial de los AMPs provoca fenómenos de curvatura dependientes de dosis y hasta el adelgazamiento y la ruptura de la bicapa (Kabelka & Vácha, 2019)

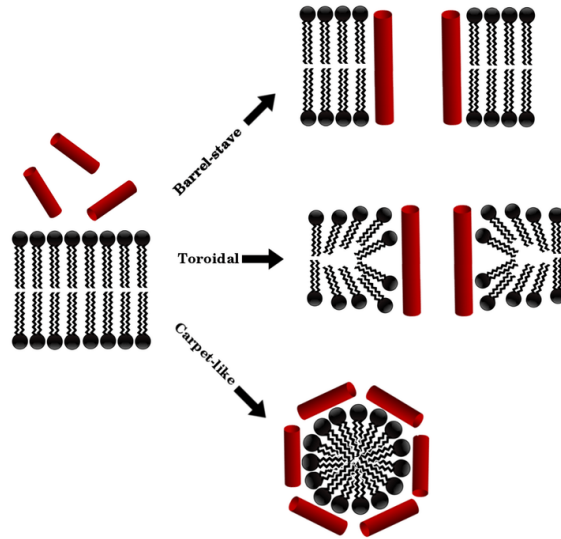


Figura 5. Mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos: Tipo barril, toroidal y tipo alfombra (carpetlike). (Balatti & Galo Ezequiel et al, 2020).

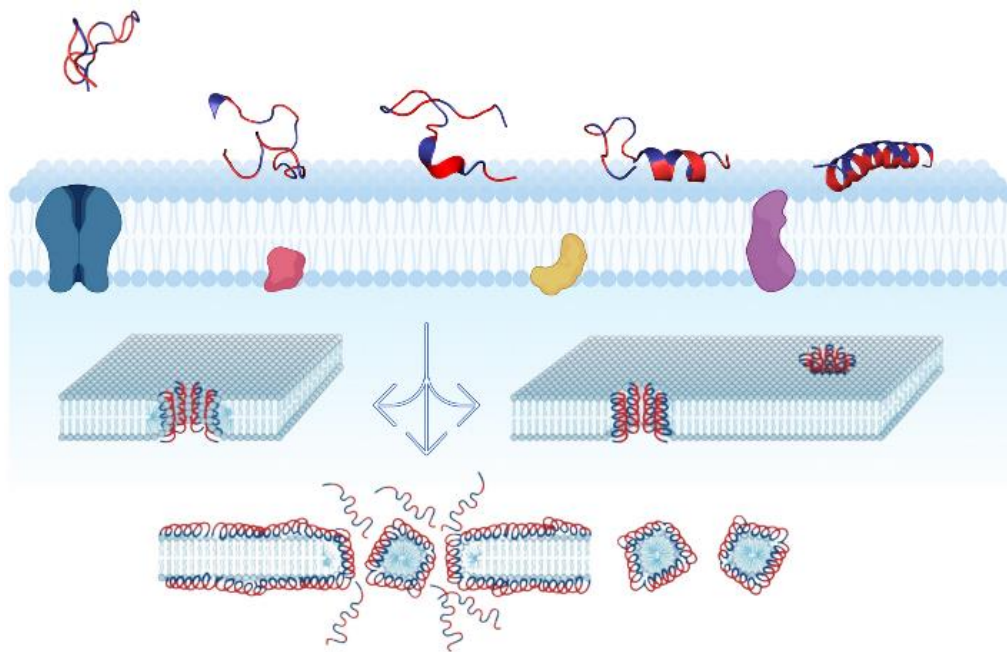


Figura 6. Permeación de la membrana mediante distintos mecanismos. En el modelo de barril, los péptidos se insertan perpendicularmente formando un anillo que atraviesa la bicapa y crea un canal transmembrana. En el modelo toroidal los lípidos y péptidos cooperan formando poros que alteran la permeabilidad. En el modelo de alfombra, los péptidos recubren la superficie y, al alcanzar una concentración crítica, inducen la desintegración de la bicapa de modo detergente. Todos conducen a la pérdida de integridad de la membrana y muerte celular. (tomado de Fong-Coronado et al., 2024).

Los péptidos antimicrobianos catiónicos interactúan con las cargas negativas a nivel de superficie en las biomembranas, las cuales corresponden esencialmente a la presencia de grupos fosfato (PO_4^-). Durante esta interacción, los péptidos transitan a estados α -helicoidales

ordenados que pueden desestabilizar la integridad de la bicapa lipídica. Por otra parte, para determinar el efecto antimicrobiano de los péptidos, se realizan estudios donde estos péptidos se aplican a microorganismos patógenos y se busca observar la inhibición de la proliferación celular; asimismo, se analiza su interacción con células humanas para descartar la posibilidad de efectos no deseados (Ramírez et al., 2023).

1.3.2 Importancia biomédica de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una alternativa prometedora frente al aumento global de la resistencia a los antibióticos convencionales (Figura 7). Estos compuestos endógenos, presentes en una amplia variedad de organismos, poseen una acción rápida y directa sobre membranas microbianas, lo que dificulta el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos (Hancock & Sahl, 2006).

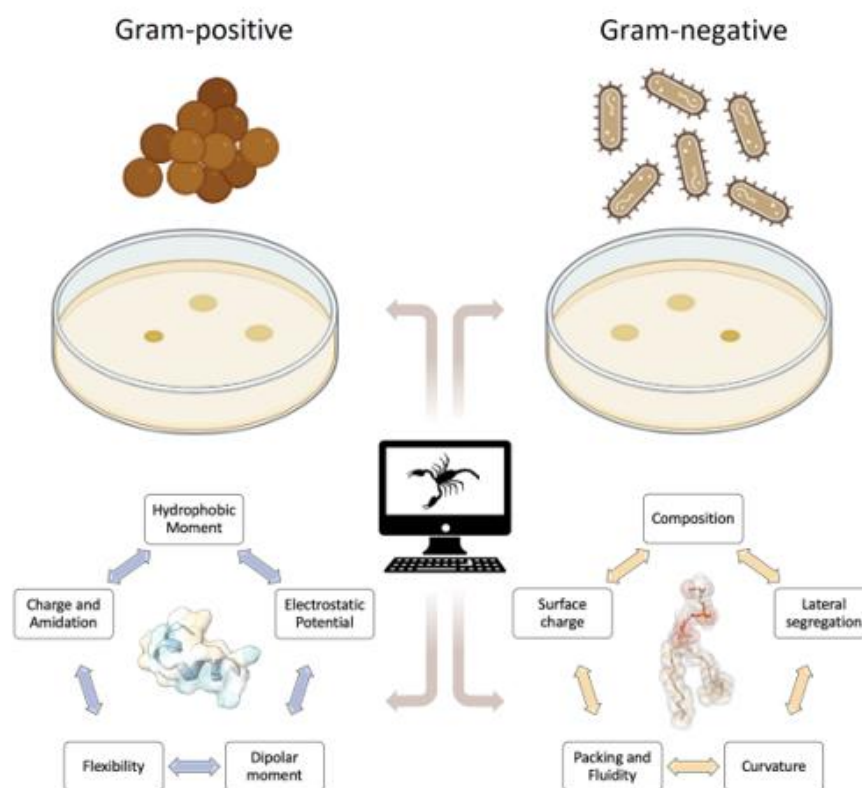


Figura 7. Figura modificada de Fong-Coronado et al. (2024), de “A Critical Review of Short Antimicrobial Peptides from Scorpion Venoms, Their Physicochemical Attributes, and Potential for the Development of New Drugs”. La actividad de los péptidos maduros contra bacterias grampositivas y gramnegativas depende de sus propiedades fisicoquímicas, que pueden optimizarse in silico, así como de las propiedades lipídicas. composición lipídica de las membranas microbianas.

Más allá de su función antimicrobiana, los AMPs también poseen propiedades inmunomoduladoras, como la regulación de citoquinas, quimioatracción de células inmunes y promoción de la cicatrización de heridas, lo que los convierte en candidatos atractivos para

terapias combinadas en enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas (Mookherjee et al., 2020).

1.4 Veneno de escorpión

Los venenos de escorpión son mezclas complejas que contienen péptidos y proteínas con actividades neurotóxicas, insecticidas, citotóxicas y antimicrobianas. Desde su descubrimiento se han venido estudiando por sus toxinas, las cuales modifican la actividad de canales iónicos de sodio, potasio, calcio y cloro, así como receptores en membranas de células excitables. Sin embargo, en las últimas décadas se han identificado numerosos péptidos cortos con actividad antimicrobiana y bajo potencial hemolítico, lo que abre la puerta para su uso farmacológico (Amorim et al., 2018; Shah et al., 2018; Rodríguez, Villegas & Corzo, 2014). En suma, el veneno de estos artrópodos constituye un cóctel complejo de moléculas bioactivas que incluye péptidos, proteínas, enzimas y otros compuestos de bajo peso molecular, muchos de los cuales presentan potencial terapéutico (Figura 8). En específico, las toxinas encontradas en estos venenos destacan al ser capaces de generar las manifestaciones fisiológicas características del envenenamiento escorpiónico, que incluyen dolor, arritmias, hipertensión, entre otras respuestas (Quintero et al., 2017).

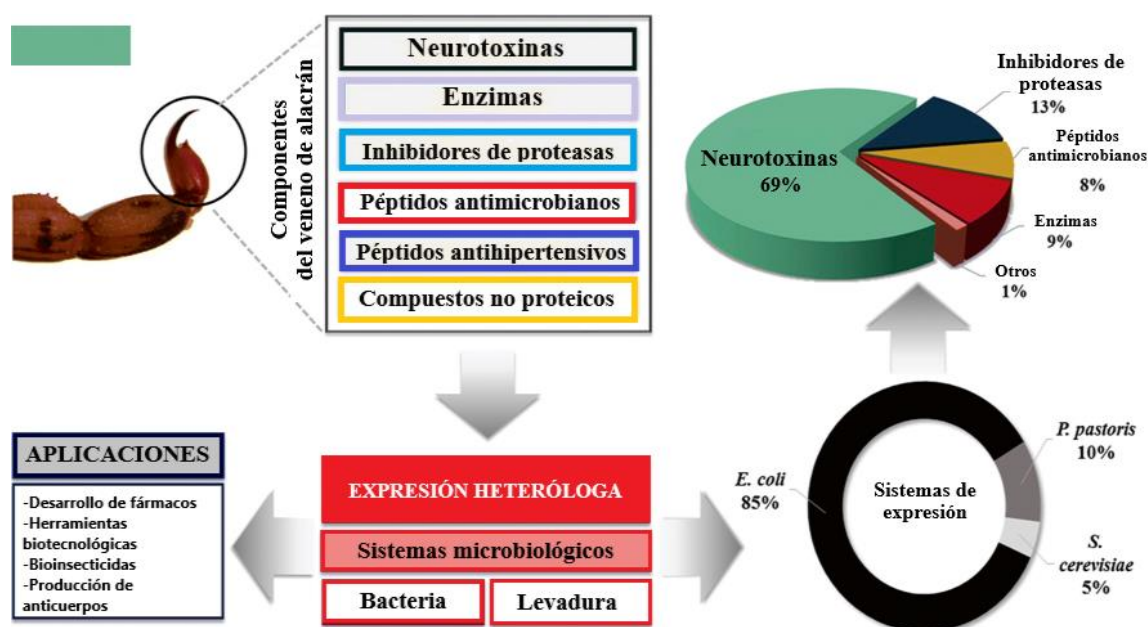


Figura 8. Componentes del veneno de escorpión y sus aplicaciones para combatir diversos patógenos bacterianos. El veneno de escorpión está compuesto por neurotoxinas y biomoléculas entre las cuales aproximadamente un 8% son PAM que se pueden producir a partir de sistemas de expresión como *E. Coli* para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

No obstante, más allá de su toxicidad, el veneno de escorpión ha sido una fuente prolífica de biomoléculas con aplicaciones biomédicas en campos tan diversos como el diseño de antibióticos, agentes antitumorales, inmunomoduladores y herramientas para el estudio de las neurociencias. Péptidos como las pantininas representan un claro ejemplo de

cómo un componente originalmente tóxico puede convertirse en un modelo de interés farmacológico. Así, el estudio composicional y estructural de estos péptidos no solo contribuye a la comprensión de la biología del escorpión, sino también a la búsqueda de soluciones frente a problemas médicos actuales como la resistencia bacteriana.

1.4.1 Veneno de escorpiones con efecto antimicrobiano

Se han descrito varios péptidos antimicrobianos originados en venenos de muchas especies de escorpión, destacando especies fuera del género *Pandinus* que han sido ampliamente estudiadas. Un ejemplo representativo es *Tityus stigmurus* (Figura 9), un escorpión ampliamente distribuido en Brasil, cuyo veneno contiene el péptido llamado estigmurina, un compuesto catiónico con fuerte actividad antibacteriana.

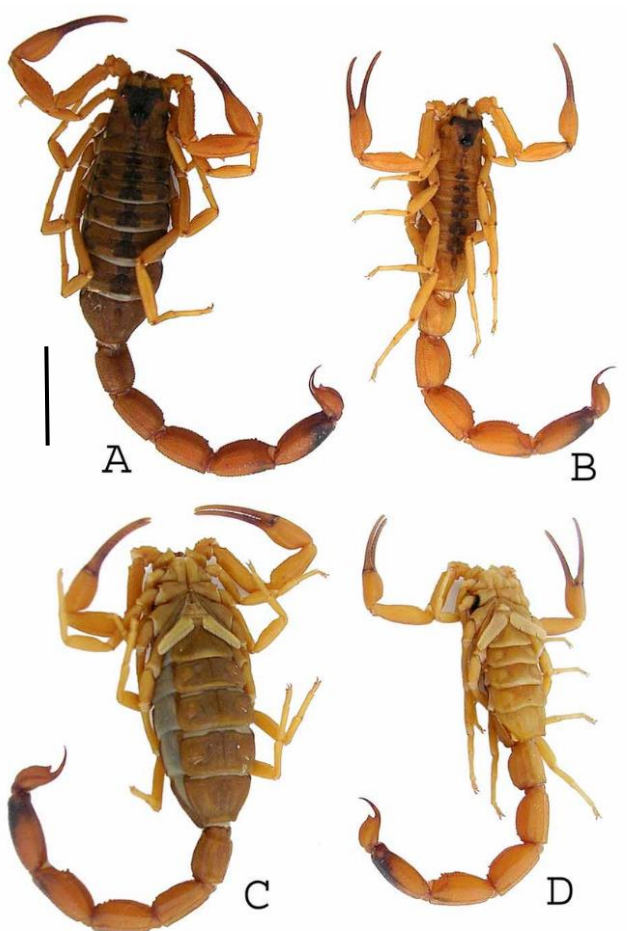


Figura 9. *T. stigmurus*. Hembra en vista dorsal (A) y ventral (C); Macho en vista dorsal (B) y ventral (D). Barras de escala: 10 mm (A-B). Longitud corporal 55,6–57,1 (hembra) 60,3–63,8 mm (macho). (De Souza et al., 2009)

La estigmurina ha mostrado actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo cepas resistentes, mediante un mecanismo asociado a la desestabilización de membranas bacterianas (Barbosa et al., 2017). Su naturaleza

anfipática favorece su inserción en bicapas lipídicas, provocando permeabilización y muerte celular, lo que le convierte en un candidato relevante para el desarrollo de nuevos antimicrobianos de origen natural. Trabajos recientes han caracterizado péptidos con actividad frente a aislados clínicos multirresistentes. Esto demuestra el potencial farmacológico de dicha fuente natural (Cesa-Luna et al., 2019; Fong et al., 2024).

1.5 Pantininas

Las pantininas son péptidos antimicrobianos derivados de los escorpiones, de la especie *P. imperator*. Estas moléculas presentan propiedades fisicoquímicas particulares que determinan su actividad biológica (Zeng et al., 2013). Se describen tres secuencias (Pantinina 1, 2 y 3) con actividad frente a bacterias Gram positivas y propiedades fisicoquímicas compatibles con actividad membranotrópica. Estos péptidos han sido objeto de diversos estudios para explorar su estructura, actividad y posibilidad de diseño de análogos con propiedades mejoradas (Zeng et al., 2013; Quintero, Cesa & Muñoz, 2017; Fong et al., 2024).

Estructura:

- Tamaño: De 13 a 20 aminoácidos
- Carga neta: positiva
- Estructura secundaria: α -hélice en ambientes hidrofóbicos
- Distribución anfipática: Una cara hidrofóbica y una cara hidrofílica.

Ejemplo: Pantinina 1, Secuencia: GILGKLWEGFKSIV-NH₂

Esta secuencia presenta un residuo de glicina al inicio, varios residuos de lisina que confieren carga positiva y residuos hidrofóbicos alternantes que facilitan la formación de una hélice anfipática (Zeng et al., 2013).

1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las pantininas aisladas del veneno de escorpión

Las pantininas muestran alta estabilidad en ambientes hidrofóbicos, elevada afinidad por membranas bacterianas, carga neta positiva, bajo peso molecular y ausencia de puentes disulfuro. Estos factores son esenciales para su actividad antimicrobiana y su viabilidad como fármacos; además de poseer una modificación química que consiste en la presencia de su grupo amida en su extremo C-terminal, exhiben actividad antimicrobiana que puede explicarse en función de los mismos parámetros, particularmente modulando su grado de helicidad (Zeng et al., 2013; Quintero et al., 2017; Salazar-Hernandez et al., 2023).

Además, las modificaciones estructurales racionales, como la sustitución de ciertos residuos (por ejemplo, glicina por treonina en posiciones clave), permiten optimizar propiedades deseadas como la afinidad por membranas bacterianas, estabilidad estructural y balance funcional (mBf). Por esta razón, en este estudio se propone un análisis comparativo entre pantininas nativas y variantes diseñadas para explorar su potencial terapéutico, tal y como se ha explorado por algunos autores (Fjell et al., 2012).

1.6 Aplicaciones terapéuticas potenciales de las pantininas

El interés en las pantininas como péptidos antimicrobianos se fundamenta en su capacidad para desestabilizar membranas bacterianas sin depender de un blanco molecular único (Figura 6), lo que dificulta el desarrollo de resistencia y las posiciona como alternativas frente al incremento global de múltiples patógenos multirresistentes. Se ha demostrado que péptidos de esta clase presentan actividad bactericida de amplio espectro, incluyendo cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *P. aeruginosa* multirresistentes, ambas consideradas amenazas críticas por la Organización Mundial de la Salud (da Cunha et al., 2017).

1.7 Uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de péptidos antimicrobianos

El uso de herramientas computacionales ha revolucionado la investigación de los AMPs, al permitir la predicción estructural, fisicoquímica y funcional de nuevos péptidos, así como el análisis racional de variantes con actividad mejorada. Plataformas basadas en inteligencia artificial, como AlphaFold, han demostrado una alta precisión en la predicción de estructuras tridimensionales a partir de la secuencia primaria (Jumper et al., 2021). De manera complementaria, herramientas bioinformáticas como ProtParam permiten estimar parámetros fisicoquímicos relevantes, incluyendo peso molecular, carga neta e índice de hidrofobicidad (Gasteiger et al., 2005), mientras que servidores como HeliQuest facilitan el análisis de la anfipaticidad y del momento hidrofóbico en estructuras helicoidales, propiedades estrechamente relacionadas con la actividad antimicrobiana (Gautier et al., 2008). La informatización del proceso de descubrimiento y optimización de péptidos antimicrobianos (AMPs) ha transformado las estrategias experimentales tradicionales, permitiendo priorizar candidatos, predecir estructuras y proponer modificaciones racionales antes de la síntesis química y los ensayos *in vitro*. Los AMPs derivados de venenos de arácnidos (entre los cuales se incluyen las pantininas de *P. imperator*) presentan variaciones en carga, hidrofobicidad y distribución de residuos que determinan su mecanismo de acción (interacción con membranas, formación de poros o inhibición de dianas intracelulares), por lo que una evaluación computacional previa es altamente informativa para diseñar y seleccionar variantes con mayor probabilidad de actividad y menor citotoxicidad (Zeng et al., 2013; Cesa-Luna et al., 2019).

El análisis *in silico* combina predicción estructural tridimensional con métricas fisicoquímicas clave, las cuales incluyen: (1) el índice GRAVY como medida global de hidrofobicidad; (2) el momento hidrofóbico (μH), que cuantifica la segregación de residuos hidrofóbicos en hélices (indicador de carácter anfipático), y (3) el momento dipolar (μ), relacionado con el alineamiento de los vectores dipolares generados en cada enlace peptídico a lo largo de la cadena principal. Estas propiedades correlacionan estrechamente con la capacidad de los péptidos para insertarse en membranas, formar poros y mostrar actividad antimicrobiana, como se ha demostrado en modelos anfipáticos α -helicoidales y en estudios de optimización de carga/hidrofobicidad. En trabajos clásicos y recientes se documenta que

la anfipaticidad y la carga neta son determinantes críticos de actividad antimicrobiana y su selectividad (Agawa et al., 1991; Dathe et al., 2001; Bahar & Ren, 2013).

El uso combinado de estas herramientas está respaldado por la literatura que vincula propiedades fisicoquímicas y mecanismos de acción: la interacción y formación de poros acuosos en bicapas lipídicas mediante la multimerización de péptidos básicos anfipáticos depende tanto de la longitud y la anfipaticidad como de la distribución de cargas (Agawa et al., 1991; Nomura et al., 2004), mientras que algunos estudios de optimización han mostrado que modificaciones en la carga y en la hidrofobicidad incrementan o disminuyen la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad (Dathe et al., 2001; Bahar & Ren, 2013). Además, los péptidos de veneno se han estudiado ampliamente como fuente de AMPs con aplicaciones ante la resistencia bacteriana, lo que justifica la inversión en cribado y diseño computacional para acelerar la identificación de candidatos con potencial farmacológico (Ageitos et al., 2022; Fong et al., 2024).

2. ANTECEDENTES

P. imperator (Figura 10), conocido comúnmente como escorpión emperador, es una de las especies de escorpiones más grandes del mundo y pertenece a la familia Scorpionidae. Esta especie es originaria de África Occidental, con distribución documentada en Ghana, Togo, Benín, Guinea, Liberia, Sierra Leona y Nigeria, donde habita principalmente ambientes tropicales con alta humedad y suelos aptos para la excavación (Prendini, 2004; Rein, 2023).



Figura 10. *Pandinus imperator*

Morfométricamente, *P. imperator* alcanza entre 18 y 21 cm de longitud (Figura 11) (Holstein et al., 2017), presentando un exoesqueleto negro brillante y pedipalpos robustos que utiliza para capturar presas mediante fuerza mecánica más que dependencia del veneno (van der Meijden et al., 2010). Su comportamiento es mayormente nocturno y suele refugiarse en madrigueras profundas, tanto excavadas por él mismo como habitadas previamente por otros organismos. A diferencia de especies altamente peligrosas, su veneno es considerado de baja toxicidad, provocando síntomas locales moderados en humanos (Isbister & Graudins, 2003).

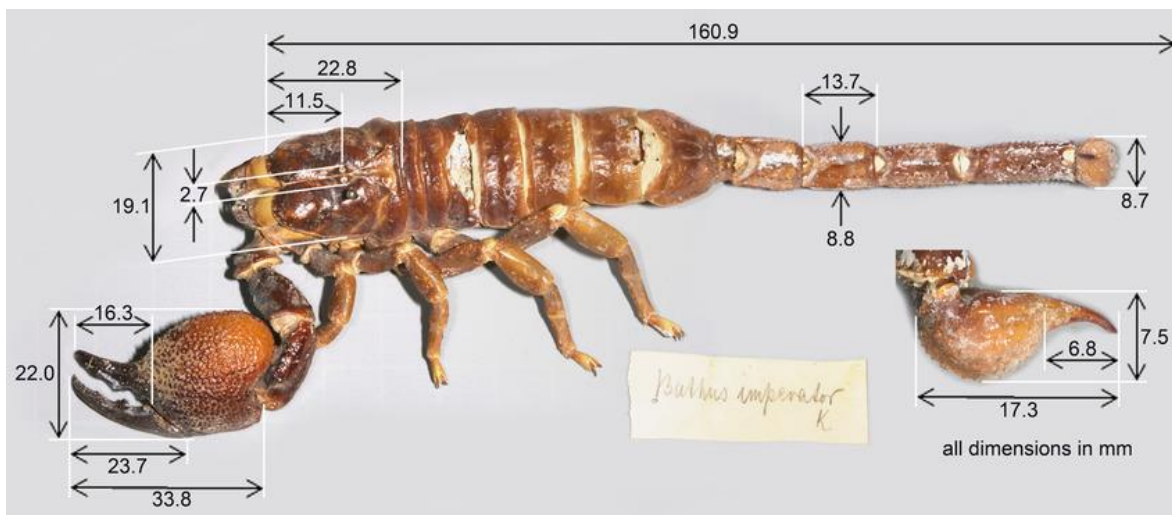


Figura 11. *Buthus imperator*, fotografía del holotipo con medidas (Holstein et al., 2017)

El veneno de este escorpión (Figura 8) es una mezcla compleja de biomoléculas bioactivas que incluyen péptidos, proteínas, enzimas, nucleótidos, aminas biógenas, sales y otros compuestos de bajo peso molecular (Gomes et al., 2021). Este veneno se produce en las glándulas ubicadas en el telson que es el último segmento del abdomen (Figura 12) y se extrae generalmente mediante estimulación eléctrica controlada, seguida de una recolección y purificación del fluido venenoso.

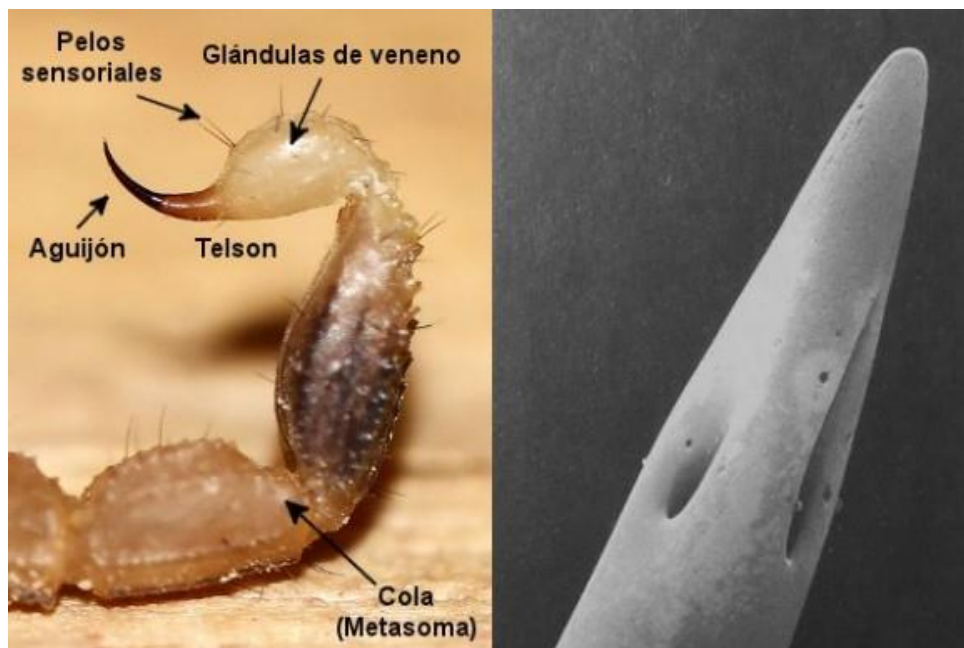


Figura 12. Telson de un escorpión (izquierda) y detalle del agujón mostrando los orificios para cada glándula de veneno (derecha).

Dentro de esta mezcla se han identificado numerosos péptidos con propiedades antimicrobianas, entre ellos las pantininas. Estos péptidos son generalmente cortos,

cationicos, y se aíslan mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel y espectrometría de masas (Zeng et al., 2013). El análisis del veneno ha revelado que cerca del 70% de los componentes son péptidos bioactivos, siendo muchos de ellos ricos en estructuras α -helicoidales sin enlaces disulfuro, lo cual es característico de las pantininas. La caracterización composicional del veneno no solo permite entender mejor el mecanismo de acción de estos péptidos, sino también seleccionar candidatos con alto potencial farmacológico para futuras terapias.

Zeng et al. (2024) realizaron una revisión exhaustiva sobre los péptidos antimicrobianos cortos derivados del veneno de escorpión y destacaron que las pantininas de *P. imperator* presentan actividades antimicrobianas relevantes. En la Tabla 1 (Fong-Coronado et al., 2024) de su estudio, los autores reportan que Pantinina-1, Pantinina-2 y Pantinina-3 muestran actividad frente a *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes a fármacos, así como frente a otros microorganismos evaluados. Estos datos confirman que las pantininas actúan como AMPs con potencial farmacológico. La información reorganizada y presentada en esta tesis se basa en los datos originales de dicha tabla y se incluye para contextualizar la importancia de estas moléculas dentro del estudio de péptidos antimicrobianos provenientes de escorpiones.

Tabla 1. Actividades antimicrobianas y hemolíticas de los AMPs en *S. aureus*, bacterias resistentes a fármacos y algunos virus

Péptido	Tamaño	Cepa	Hemólisis ^b	Referencias
Pantinina-2	13-aa	<i>S. aureus</i> AB94004 (48 μ M)	8% a 16 μ M	Zeng y otros (2013)
Pantinina-1	14-aa	<i>S. aureus</i> AB94004 (8 μ M)	21% a 64 μ M	Zeng y otros (2013)
Pantinina-3	13-aa	<i>S. aureus</i> AB94004 (16 μ M)	70% a 16 μ M	Zeng y otros (2013)

Asimismo, un estudio reciente de Zhang et al. (2020) comparó la estructura de la Pantinina 1 con la Pantinina 2, destacando las diferencias en la distribución de residuos hidrofóbicos y su implicación en la estabilidad de la proteína. Estas variaciones estructurales podrían ser fundamentales para mejorar las propiedades funcionales de las pantininas en aplicaciones biotecnológicas.

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento global de microorganismos resistentes a múltiples fármacos representa una de las mayores amenazas para la salud pública, limitando la eficacia de los antibióticos convencionales y generando la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (WHO, 2024). En este contexto, los péptidos antimicrobianos (AMPs) destacan como alternativas prometedoras debido a su amplio espectro de acción, rápida actividad bactericida y baja probabilidad de inducir resistencia microbiana (Zhang & Gallo, 2016).

Dentro de este grupo, las pantininas, péptidos presentes en el veneno del escorpión *P. imperator*, han demostrado poseer propiedades antimicrobianas relevantes; sin embargo, su caracterización estructural y su potencial farmacológico siguen siendo áreas poco exploradas (Torres-Larios et al., 2019). La falta de estudios profundos sobre su composición, estructura tridimensional y mecanismos de acción limita el aprovechamiento de estas moléculas como candidatos terapéuticos.

El uso de herramientas bioinformáticas y de modelaje estructural permite analizar propiedades fisicoquímicas, predecir la conformación tridimensional, identificar regiones funcionales y diseñar variantes mejoradas con mayor estabilidad, selectividad y actividad antimicrobiana (Mahlapuu et al., 2020). Estas tecnologías reducen costos, tiempos experimentales y permiten orientar la síntesis hacia moléculas más prometedoras antes de realizar ensayos biológicos.

Por ello, el estudio composicional y estructural de las pantininas presentes en *P. imperator* constituye un aporte significativo tanto para la caracterización de AMPs derivados de venenos, como para el desarrollo de nuevos candidatos terapéuticos con aplicaciones en biomedicina. Asimismo, este trabajo fortalece las líneas de investigación nacionales en biología computacional, bioinformática, diseño de péptidos terapéuticos y farmacología molecular, contribuyendo al avance científico en áreas estratégicas para la salud pública en México.

4. HIPÓTESIS

Dado un análisis exhaustivo de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las pantininas, y considerando los modelos mecanísticos de acción para esta clase de biomoléculas, el análisis computacional permitirá predecir secuencias de pantininas con atributos moleculares optimizados, que podrían asociarse a un mayor potencial antimicrobiano

5. OBJETIVOS

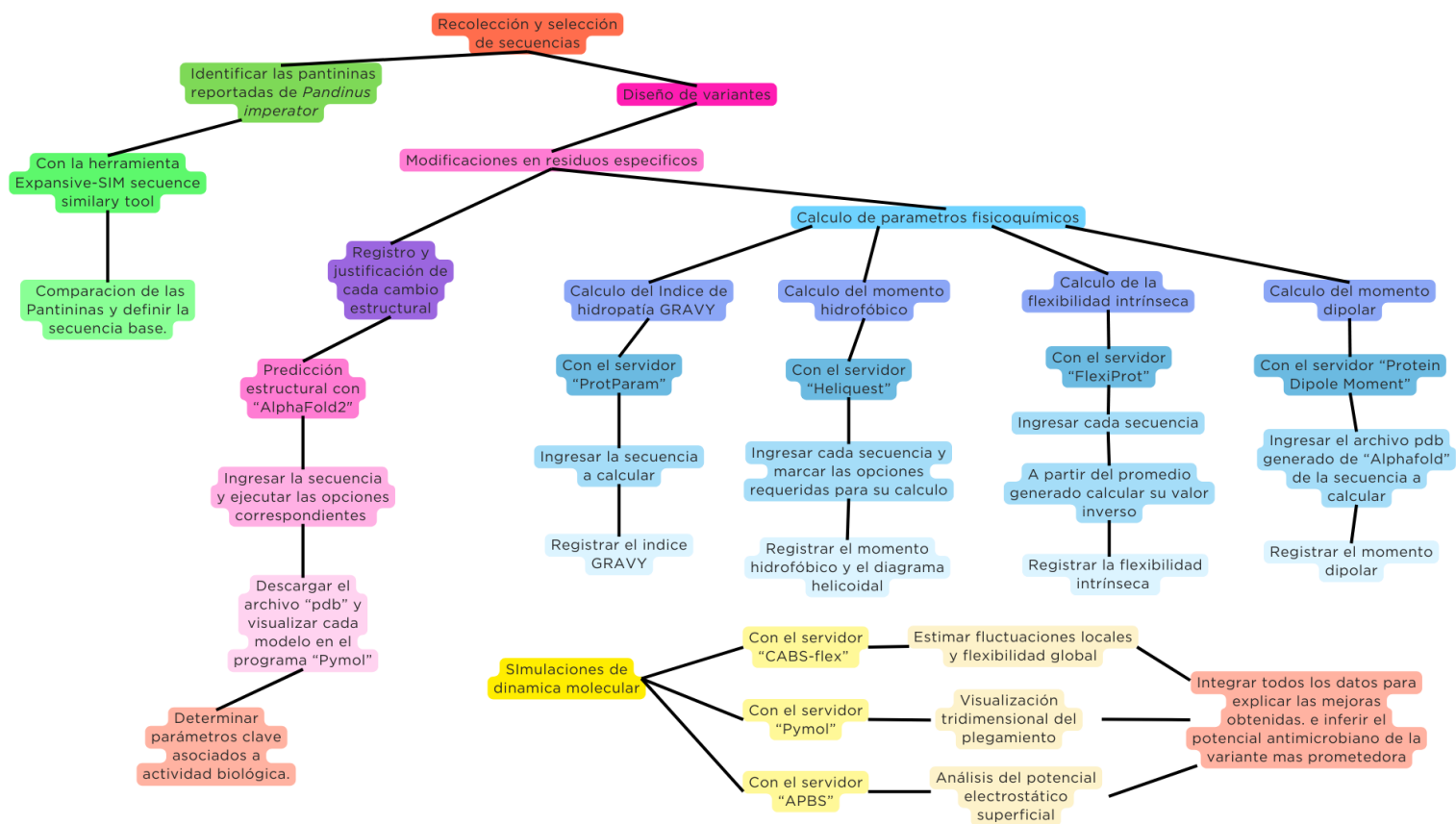
5.1 Objetivo general

Generar un modelo optimizado de la Pantinina 2 mediante la modificación de sus propiedades fisicoquímicas que exhiba un mejor desempeño conformacional con respecto a la Pantinina 1.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis comparativo de las secuencias y estructuras de las pantininas 1 y 2, con el fin de identificar diferencias clave en su composición y propiedades fisicoquímicas.
- Calcular los principales parámetros fisicoquímicos para cada modelo: momento hidrofóbico, momento dipolar, flexibilidad intrínseca, e índice GRAVY.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular para cada modelo y determinar la estabilidad conformacional de las variantes optimizadas.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Herramientas bioinformáticas

AlphaFold, PyMOL, ProtParam, Heliquest, Protein Dipole Moments Server, Flexiprot.

7.2 Material biológico

En esta investigación no será necesario el uso de material biológico.

7.3 Equipos

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

- Sistema operativo compatible, como Windows 10 o posterior, macOS 12 o posterior, o Linux.
- Cantidad mínima de memoria RAM.
- Software adicional: Navegador actualizado, Microsoft Excel, SigmaPlot, PyMOL.

7.4 Obtención de secuencias

Se recopilarán las secuencias de las pantininas reportadas en la literatura y bases de datos.

7.5 Análisis composicional

El alineamiento par de las secuencias de las pantininas se realiza utilizando la herramienta SIM - Sequence Similarity Tool disponible en ExPASy, la cual permite evaluar similitudes y diferencias entre péptidos mediante un análisis de comparación directa y visual de residuos conservados.

7.6 Análisis estructural

Las secuencias serán sometidas a predicción estructural con AlphaFold, que es un sistema de inteligencia artificial que se especializa en la predicción de la estructura tridimensional de péptidos y proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos.

7.7 Cálculo de los parámetros fisicoquímicos

7.7.1 Índice de hidropatía GRAVY (Grand Average of Hydropathy)

Se calcula mediante la herramienta ProtParam (ExPASy), útil para estimar el grado de hidrofobicidad promedio del péptido, para inferir su comportamiento en ambientes acuosos o membranas.

7.7.2 Momento hidrofóbico (μH)

Utilizando la herramienta HeliQuest para evaluar la disposición de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en una hélice α .

7.7.3 Flexibilidad intrínseca (mBf)

Utilizando la herramienta FlexiProt, que calcula la flexibilidad intrínseca de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos.

7.7.4 Momento dipolar (μ)

Se ocupa AlphaFold, que predice con gran precisión la estructura 3D de proteínas y péptidos a partir de su secuencia. Permite observar la orientación espacial de cargas y la forma del péptido, lo cual se relaciona con su actividad antimicrobiana. Además, se usa Dipole.proteopedia.org, herramienta que visualiza y cuantifica el momento dipolar en proteínas o péptidos estructurados.

7.8. Diseño de variantes

Se diseñaron variantes modificadas de las pantininas mediante cambios puntuales en residuos específicos de la secuencia original, con el objetivo de optimizar propiedades como la estabilidad estructural y afinidad por membranas. Para la selección de los sitios de modificación, se realizó previamente un análisis detallado de los parámetros fisicoquímicos previamente calculados. A partir de esto se propusieron sustituciones racionales en posiciones estratégicas que permitan generar variantes con un perfil más favorable en términos de funcionalidad y eficacia antimicrobiana. Este enfoque busca mantener la estructura general α -helicoidal y la distribución anfipática característica, optimizando al mismo tiempo el comportamiento molecular de los péptidos en medios acuosos.

7.8.1 Comparación y evaluación de variantes

Se realizó una comparación cuantitativa de los parámetros fisicoquímicos de las pantininas modificadas frente a las pantininas originales (Pantinina 1 y Pantinina 2). Para ello, se evaluaron los valores obtenidos de GRAVY, momento hidrofóbico (μH), momento dipolar (μ), flexibilidad intrínseca media (mBf), y otras propiedades relevantes. Esta comparación permitió identificar las modificaciones estructurales que contribuyeron a una optimización funcional de cada péptido.

7.8.2 Simulaciones de dinámica molecular utilizando herramientas computacionales

Estas simulaciones permitirán analizar el comportamiento estructural y la estabilidad de las pantininas modificadas en un entorno acuoso, evaluando factores como la flexibilidad estructural a lo largo del tiempo, la formación de estructuras secundarias estables y el comportamiento dinámico de regiones clave involucradas en la interacción con membranas lipídicas.

8. METODOLOGÍA

8.1 Búsqueda de las secuencias para cada péptido

En la literatura ya se encuentran reportadas las secuencias de las pantininas presentes en el veneno de *P. imperator*, descritas en diversos estudios enfocados en péptidos antimicrobianos derivados de escorpiones. Las secuencias de Pantinina 1 y Pantinina 2 han sido referidas en análisis estructurales y funcionales dentro del artículo “Structural and Functional Diversity of Scorpion Venom Peptides with Antimicrobial Activity” (Torres-Larios et al., 2019), donde se discuten sus características fisicoquímicas y su relevancia como posibles agentes terapéuticos. Además, el artículo de revisión “A Critical Review of Short Antimicrobial Peptides from Scorpion Venoms, Their Physicochemical Attributes, and Potential for the Development of New Drugs” (Fong-Coronado et al., 2024) fue consultado para contextualizar las pantininas dentro del grupo de péptidos antimicrobianos cortos presentes en venenos de escorpiones. Este trabajo ofrece un panorama comparativo de las características estructurales y fisicoquímicas comunes en este tipo de péptidos, permitiendo validar que las propiedades observadas en las pantininas coinciden con los patrones generales de los péptidos antimicrobianos escorpiónidos descritos en la literatura especializada.

8.2 Comparación de las secuencias

Se llevó a cabo la comparación de la cadena de aminoácidos de las Pantininas 1 y 2, esto se realiza utilizando la herramienta SIM - Sequence Similarity Tool disponible en ExPASy.

En el navegador de internet buscar la herramienta <SIM - Alignment Tool for Protein Sequences> de Expasy y abrir la página señalada en la siguiente imagen:

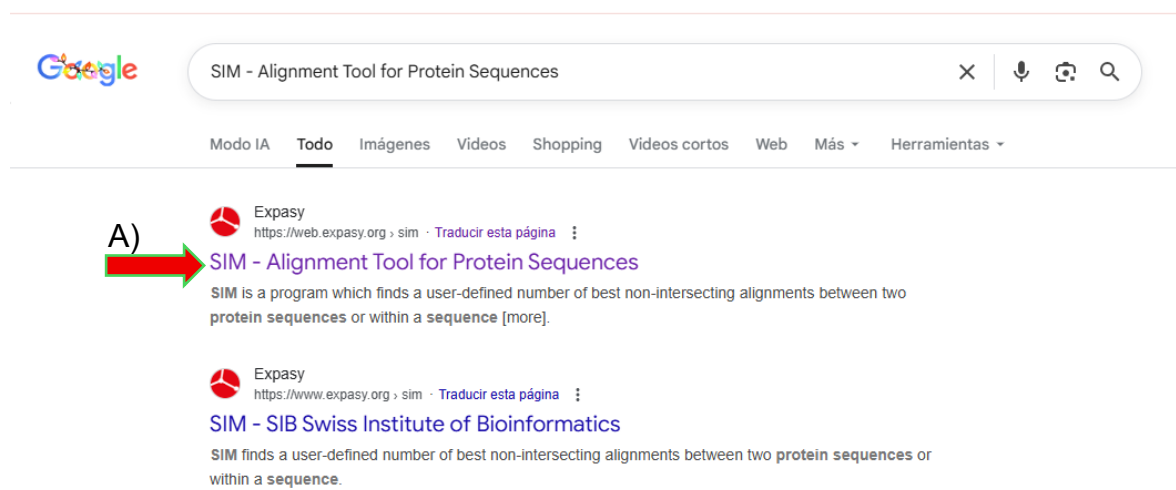


Figura 13. A) Servidor web “SIM - Sequence Similarity Tool” disponible en ExPASy utilizado para la alineación sin intersección entre dos secuencias de péptidos

Dentro del sitio web muestra una tabla, en la primer columna (Sequence 1) se escribe la primer secuencia que se desea comparar, sin espacios y en mayúscula. En la segunda

columna (Sequence 2) se escribe la segunda secuencia a comparar, sin espacios y en mayúscula como se muestra en la siguiente imagen:

A) Sequence 1: GIGKLWEGFKSIV

B) Sequence 2: IFGAIWKGISSL

Parameters:

Number of alignments to be computed: 20

Gap open penalty: 12

Gap extension penalty: 4 [documentation]

Comparison Matrix: BLOSUM62

C) Submit or RESET

Figura 14. Interfaz del servidor <SIM-Sequence Similarity Tool> Para el ingreso de secuencias. A) y B) Columnas de entrada de secuencias a comparar; C) Botón [Submit] para iniciar la comparación.

Una vez escritas ambas secuencias, activar el botón “Submit” para que empiece a hacer la comparación, una vez que termine nos mostrara los resultados marcados con un * los aminoácidos que coinciden en ambas secuencias, como se muestra en la siguiente imagen:

Alignments:

36.4% identity in 11 residues overlap; Score: 32.0; Gap frequency: 0.0%

Sequence1	3	GKLWEGFKSIV
Sequence2	3	GAIWKGISSL
		* * * *

A)

Figura 15. Resultados de la comparación de dos secuencias de aminoácidos, usando el servidor <SIM-Sequence Similarity Tool>, A) Asterisco que indica los aminoácidos iguales en ambas secuencias.

8.3 Predicción estructural con AlphaFold2

En el navegador de internet buscar la herramienta AlphaFold2 y abrir la página señalada, como se muestra en la siguiente imagen:

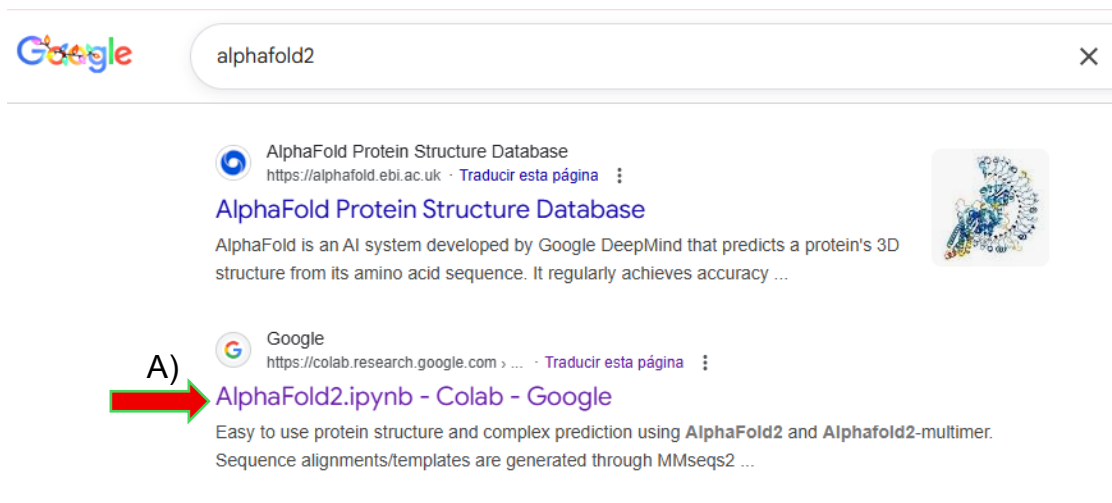


Figura 16. A) Servidor web “AlphaFold” usado para la predicción de estructuras de proteínas.

Una vez dentro, se debe ingresar la secuencia de aminoácidos del péptido en el apartado [query_sequence], mientras que en [jobname] se asigna el nombre correspondiente al péptido que se va a procesar. Posteriormente, se selecciona el botón indicado para iniciar el análisis (Figura 17). El sistema muestra una ventana de advertencia (Figura 18), en la cual es necesario elegir la opción [ejecutar de todos modos]. Una vez aceptada, se debe esperar hasta que aparezca un ícono de verificación en color verde, lo que indica que el proceso ha sido aceptado y puede continuar.

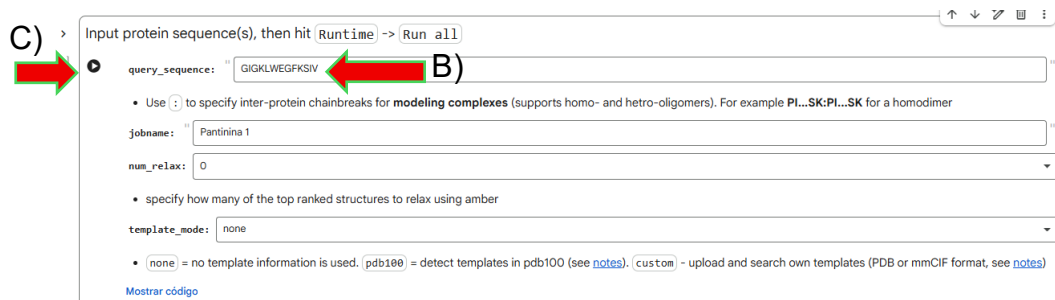


Figura 17. Interfaz inicial del servidor AlphaFold2 para la generación de estructuras. B) [query_sequence] caja de texto donde se inserta la secuencia a analizar. C) Botón de ejecutar [enter]

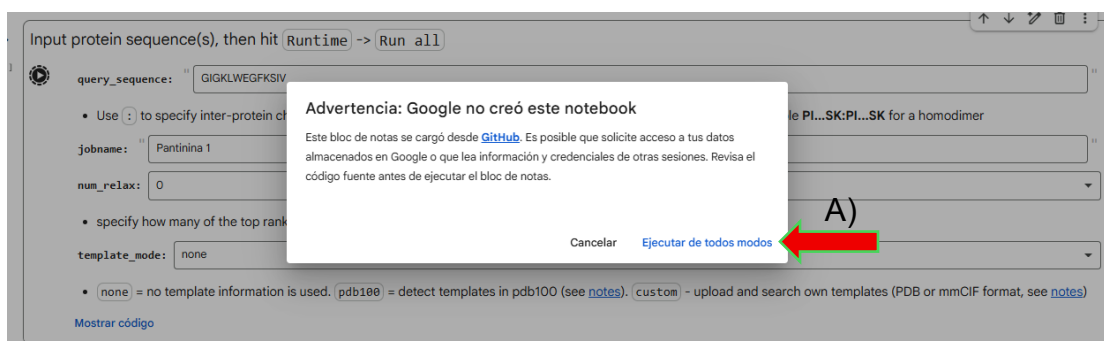


Figura 18. Interfaz inicial del servidor AlphaFold2 con el letrero ejecutar de todos modos (A).

Una vez ejecutado se muestran los datos de la secuencia del péptido que se va a procesar, se deberá revisar que los datos estén correctos antes de continuar.

Posteriormente se dirige al apartado [Install dependencias] y activar el botón para ejecutar. Lo mismo para el apartado de [MSA options] quedando como la siguiente imagen:

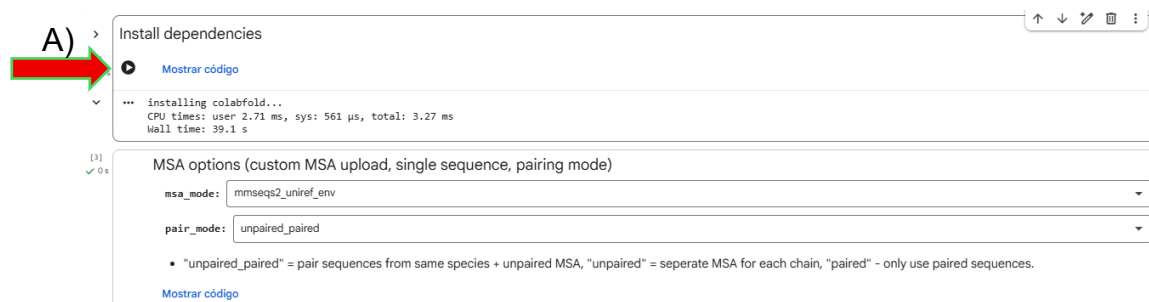


Figura 19. Interfaz del servidor “AlphaFold” para la carga de archivos. A) Botón de ejecutar [enter].

Bajando al siguiente apartado [Advanced settings] en la opción [dpi] colocar el número 300, después activar el botón para ejecutar y esperar unos segundos a que lo procese (Figura 20).

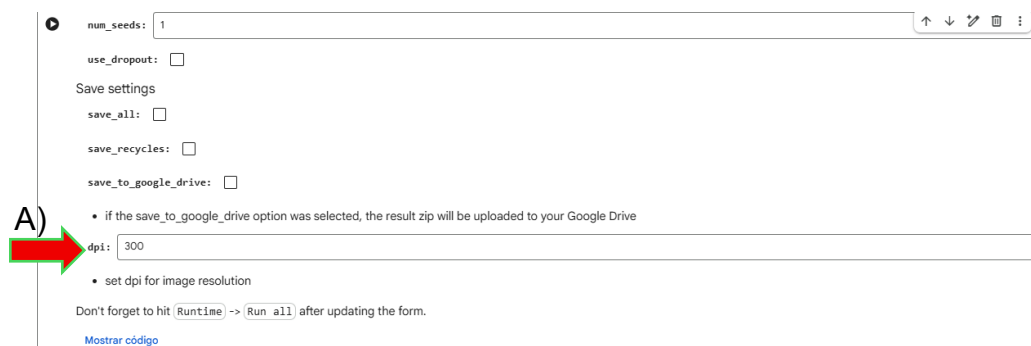


Figura 20. Interfaz del servidor “AlphaFold” de los ajustes para la resolución de la estructura a generar. A) Caja de texto para el dpi.

Posteriormente se procesarán los otros apartados, ejecutando primero el apartado de [Run Prediction] asegurándose que este seleccionado el icono de [display_images] como se muestra en la figura 21. Este apartado puede tardar unos minutos, en la parte de debajo se visualizará el porcentaje de avance.



Figura 21. Interfaz del servidor “AlphaFold” del proceso para la generación de imágenes. A) Botón de ejecutar [enter].

Una vez terminado el proceso, vamos a ejecutar el apartado que dice [Display 3D structure] (Figura 22), esperar a que termine el proceso y continuar hacia el siguiente apartado.



Figura 22. Interfaz del servidor “AlphaFold” del proceso para la generación de estructuras 3D. A) Botón de ejecutar [enter].

Activar el botón de ejecución del apartado [Plots] y esperar a que lo ejecute, posteriormente continuar en la siguiente sección.

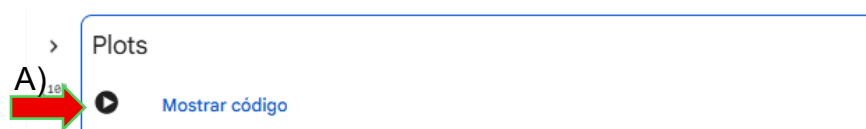


Figura 23. Interfaz del servidor “AlphaFold” del Apartado [Plots] para ejecutar la generación de estructuras. A) Botón de ejecutar [enter].

Finalmente ejecutar el apartado [Package and download results], para descargar nuestro archivo comprimido y este deberá ser descomprimido posteriormente, el archivo extraído del documento comprimido es de extensión [PDB].

8.4 Herramientas bioinformáticas para el cálculo de los parámetros fisicoquímicos

8.4.1 Cálculo del índice de hidropatía GRAVY

Para calcular el índice de anfipaticidad Gravy se utilizó la herramienta ProtParam, disponible en la plataforma ExPASy. Para acceder a ella, se ingresa el término *ProtParam* en el navegador y se selecciona la página correspondiente, tal como se muestra en la figura.

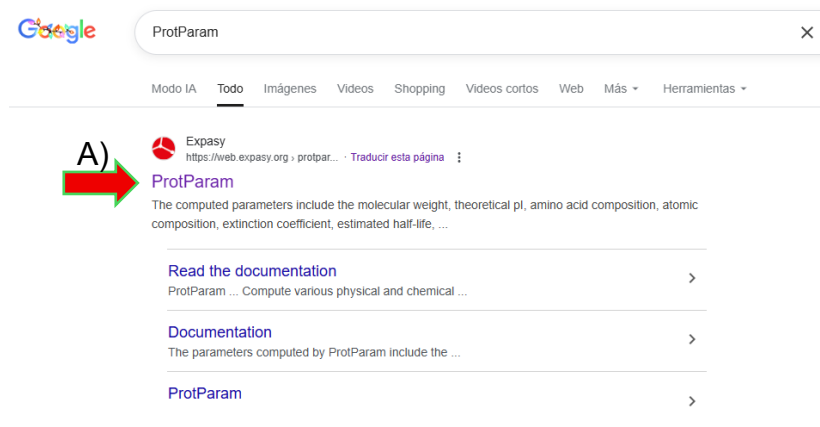


Figura 24. A) Servidor web ProtParam usado para calcular el índice de hidropatía.

Dentro del sitio, se despliega un recuadro destinado al ingreso de la secuencia a analizar. La secuencia debe introducirse utilizando el código de una letra para cada aminoácido, escrita en mayúsculas y sin espacios. Posteriormente, se selecciona la opción [Compute parameters] para iniciar el análisis (Figura 25).

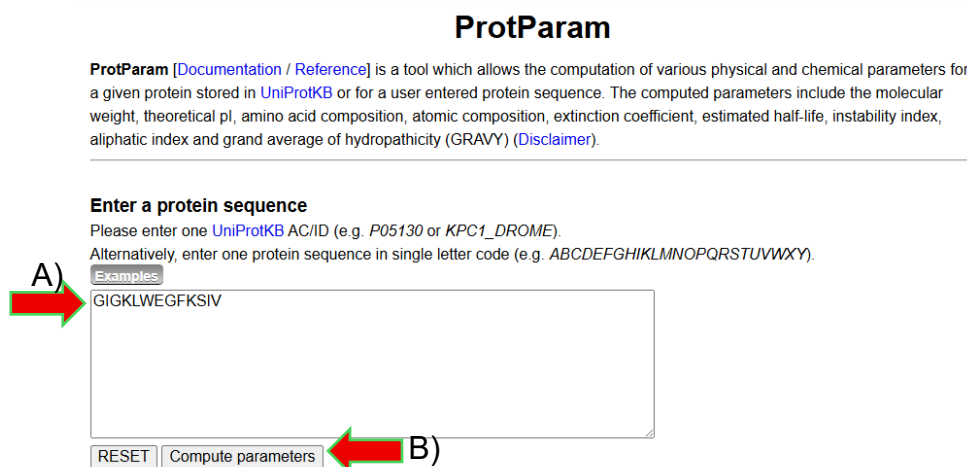


Figura 25. Interfaz del servidor ProtParam para la ejecución de una secuencia. A) caja de texto donde se introduce la secuencia a analizar. B) Botón de iniciar para calcular los parámetros

Una vez procesada la secuencia, ProtParam genera diversos parámetros, como el punto isoeléctrico (pI), el número total de residuos, y el peso molecular. Al final de la página se encuentra el parámetro Grand Average of Hydropathicity (GRAVY), que corresponde al valor utilizado en este estudio.

8.4.2 Cálculo del momento hidrofóbico con Heliquet

Haciendo uso del software en línea “Heliquet” esta herramienta permite calcular diversas propiedades fisicoquímicas, así como la composición de aminoácidos de una secuencia con conformación helicoidal. Para acceder, es necesario ingresar al navegador web

y localizar la plataforma HeliQuest; posteriormente, se debe seleccionar la opción correspondiente tal como se muestra en la figura 26.

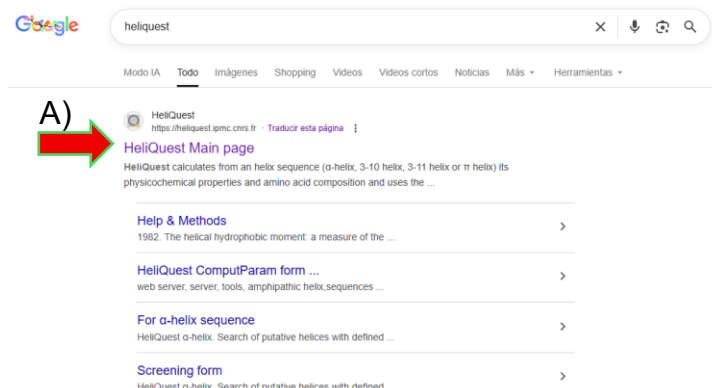


Figura 26. A) Servidor web “HeliQuest” usado para el cálculo del momento hidrofóbico.

Dentro de [sequence análisis module] (Figura 27) o bien activando la opción de [Analysis], que redirige a la página donde podremos procesar la secuencia de aminoácidos

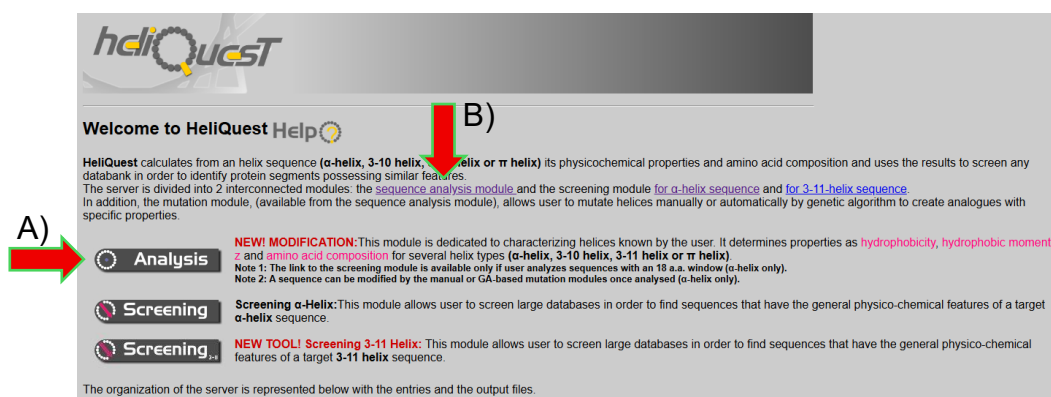


Figura 27. Interfaz del servidor “HeliQuest” de información sobre el sitio web A) y B) Redirección a la interfaz para procesar.

Una vez ahí, se introduce la secuencia de aminoácidos que se desea analizar. Esta debe escribirse utilizando únicamente el código de una letra para cada residuo, en mayúsculas y sin espacios entre ellos. En la sección [window size], se selecciona el número de residuos correspondiente al tipo de hélice que se desea evaluar; en este caso, se eligió la opción [Full], que permite considerar la totalidad de la secuencia dentro de la rueda helicoidal. Finalmente ejecuta el análisis [Process].

Figura 28. Interfaz del servidor “HeliQuest” para el análisis de una secuencia. A) Caja de texto donde se inserta la secuencia a analizar. B) número de ventanas requeridas. C) Botón [Process] para iniciar el análisis.

HeliQuest genera automáticamente el cálculo de diversas propiedades fisicoquímicas, entre ellas la hidrofobicidad, el momento hidrofóbico y la carga neta de la secuencia. Adicionalmente, la herramienta proporciona información complementaria de gran utilidad, como el número y porcentaje de residuos polares, no polares, cargados, neutros, aromáticos y aquellos clasificados como especiales.

8.4.3 Cálculo de la flexibilidad intrínseca con FlexiProt

El cálculo de la flexibilidad se realizó mediante la herramienta FlexiProt, la cual consiste en una hoja de cálculo que contiene fórmulas preprogramadas para generar automáticamente el índice de flexibilidad a partir de la secuencia de aminoácidos del péptido. Esta herramienta puede ejecutarse tanto en su versión local como desde el repositorio oficial disponible en <https://github.com/dballeza/FlexiPROT>

Una vez abierta la herramienta en el ordenador, se visualiza la hoja de cálculo mostrada en la figura 29. Es necesario desplazarse hacia la derecha hasta localizar las columnas identificadas como [AE], donde se encuentran los campos destinados al análisis.

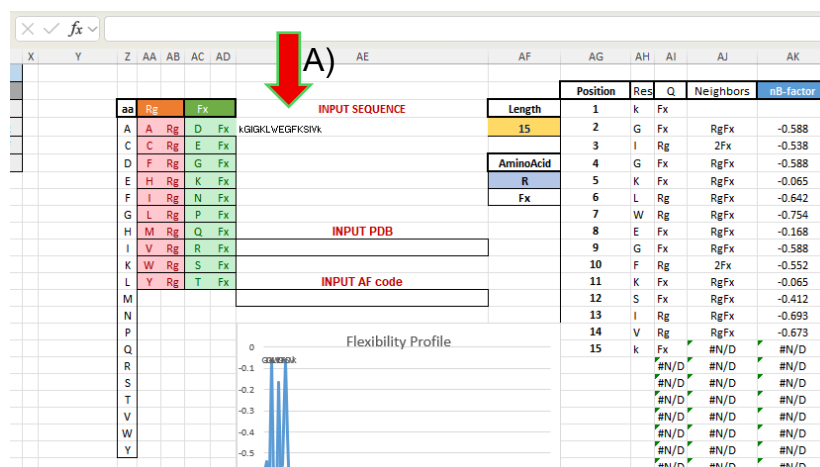


Figura 29. Herramienta “FlexiProt”. En la segunda fila se observan las iniciales de cada aminoácido y debajo de cada una se observan en cada columna los valores de radio de giro e índice de flexibilidad de cada residuo. A) Caja de texto donde insertar la secuencia a analizar.

En esta sección, se ingresa la secuencia del péptido en el espacio ubicado debajo de la celda [INPUT SEQUENCE], escribiendo los aminoácidos con su código de una letra. De acuerdo con los requisitos del archivo, se debe añadir la letra de algún residuo altamente flexible (K/R) al inicio de la secuencia y al final; esto con la finalidad de calcular de forma adecuada la flexibilidad completa de la secuencia ingresada

Posteriormente, se seleccionan únicamente los valores numéricos generados en la columna del factor B normalizado [nB-factor]. El sistema calcula automáticamente el promedio de estos datos, el cual se muestra en la parte inferior derecha de la hoja (Figura 30).

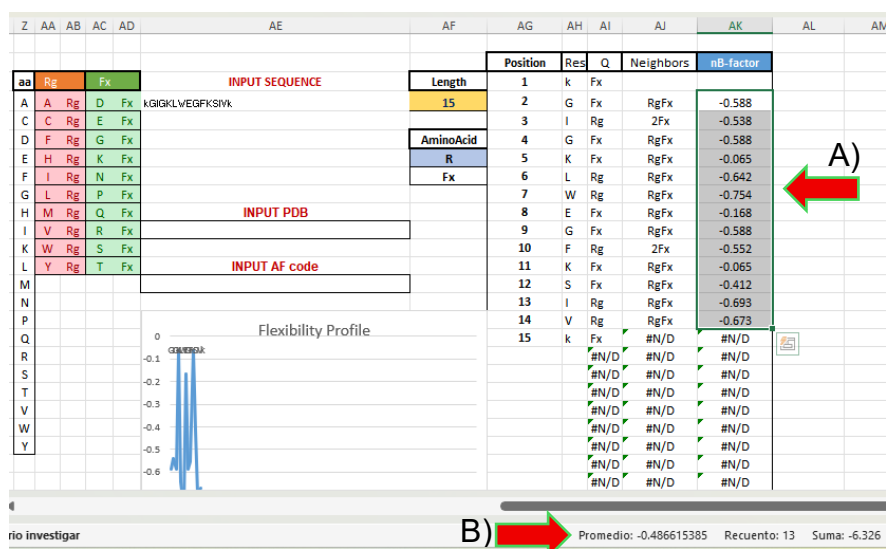


Figura 30. Ingreso de la secuencia para el cálculo de la flexibilidad intrínseca y cálculo del promedio del promedio para el parámetro “nB-factor2”. A) columna nB-factor para la selección de los resultados, B) Promedio de los datos seleccionados.

Una vez obtenido el factor-B normalizado para cada residuo (nBf), se calcula el factor-B promedio de la secuencia completa (mBf) mediante la siguiente ecuación:

$$mBf = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n nBf$$

Donde n corresponde al número total de residuos de la secuencia. El valor de mBf representa la flexibilidad intrínseca promedio de la secuencia analizada, mientras que el nBf describe la flexibilidad normalizada de cada residuo en la posición que le corresponde.

8.4.4 Cálculo del momento dipolar

Para calcular el momento dipolar, es necesario contar previamente con el archivo PDB del modelo tridimensional generado en el paso anterior mediante AlphaFold2. Una vez obtenido el archivo, se accede al navegador web y se busca la herramienta Protein Dipole Moment, ingresando al sitio mostrado en la figura.

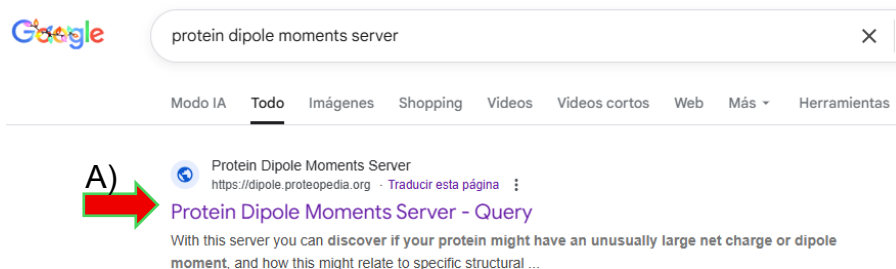


Figura 31. A) Servidor web “Protein Dipole Moment” usado para calcular el momento dipolar.

Dentro de la plataforma, se selecciona el botón [Seleccionar archivo], lo que abrirá una ventana para localizar el archivo PDB correspondiente al péptido. Después de seleccionar el modelo deseado, acceder [Open] para cargarlo en el servidor (Figura 32). Finalmente, se ejecuta el cálculo [Submit] para iniciar el procesamiento.

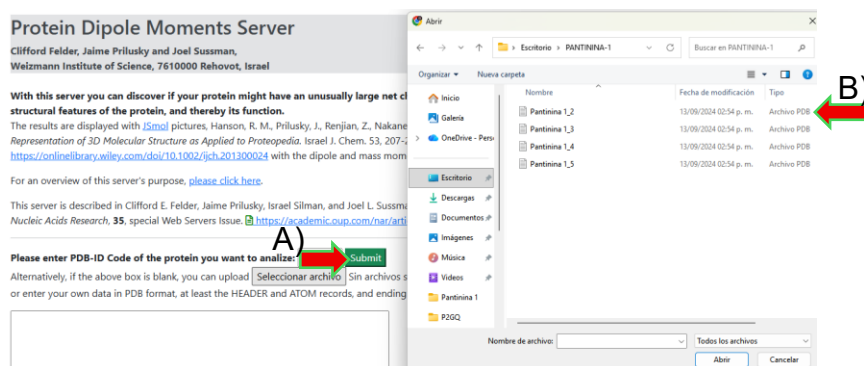


Figura 32. Interfaz del servidor “Protein Dipole Moment” para la carga de archivos en formato “pdb”. A) botón de submit para procesar el archivo compartido. B) selección del archivo a procesar en formato PDB.

El servidor genera automáticamente una tabla de resultados, en la cual se resume información relevante como el momento dipolar, la magnitud del vector dipolar y la carga neta del modelo cargado (Figura 33).

Dipole moment for

	No. of Chains=1		Elongated							
	No.Atoms	No.Res.	R _M	Pos.Res.	Neg.Res.	Charge	Dipole	Quadrupole	Crg./Nat.	Dip./Nat.
Value	144.	14.	31.50	2.	1.	1.	195.	58.	0.0069	1.3508
No.Dev.Units	-1.38	-1.41	-1.53	-1.35	-1.36	0.56	-0.83	-0.72	1.46	3.47

 Dipole vector (in atomic units): -29.70 -7.09 26.61
 Mass Moments vector: 70.04 35.56 52.53
 Open a larger Jmol window.



Figura 33. Cálculo del momento dipolar [Dipole] y otros parámetros de la secuencia; Número total de átomos, Numero de residuos de aminoácidos, Radio medio de la molécula, Numero de residuos con carga negativa total, carga neta total, momento cuadrupolar, carga por nativo y momento dipolar por nativo. A) columna del resultado del momento dipolar $\mu(D)$

8.5 Diseño de variantes:

El diseño de variantes de pantininas se desarrolló mediante un enfoque racional orientado a optimizar propiedades fisicoquímicas asociadas con la actividad antimicrobiana. Para ello, se combinaron criterios estructurales, análisis comparativo entre las pantininas reportadas y resultados obtenidos a partir de herramientas bioinformáticas. Los objetivos principales del diseño fueron preservar la naturaleza anfipática del péptido, ajustar la hidrofobicidad global, modular la carga neta y evaluar el impacto de sustituciones puntuales en el momento hidrofóbico y en el momento dipolar.

8.5.1 Criterios generales de diseño

El proceso de generación de variantes se basó en un conjunto de decisiones teóricas fundamentadas en la literatura sobre péptidos antimicrobianos (AMPs) y en la comparación directa entre la Pantinina 1 y la Pantinina 2.

Alignments:

38.5% identity in 13 residues overlap

Sequence1	2	ILGKLWEGFKSIV
Sequence2	1	IFGAIWKGISSLL
		* * * * *

Figura 34. Alineamiento de las secuencias de la Pantinina 1 y la Pantinina 2 obtenido mediante la herramienta ProtParam del servidor ExPASy. Mostrando un 38.5 % de identidad en un solapamiento de 13 residuos, destacando los residuos de: Ile (I)- Gly (G)-Trp (W)-Gly (G)-Ser (S).

Al comparar la Pantinina 1 y la Pantinina 2 se identificó que ambos péptidos comparten los residuos I-G-W-G-S (Figura 34), por lo que se decidió conservar estas posiciones en todas las variantes. Se consideró que este segmento podría representar un núcleo funcional dentro de las pantininas y que alterar esta región podría comprometer la estructura o la actividad.

8.5.2 Introducción de una glicina

La decisión de mantener una glicina (G) en la posición N-terminal se fundamentó en los resultados reportados por Fernández-Sánchez et al. (2025), quienes analizaron péptidos antimicrobianos cortos del escorpión *Urodacus yaschenkoi* mediante dinámica molecular. En dicho estudio, los autores compararon dos secuencias casi idénticas que diferían únicamente en la presencia de una “G-cap” en el extremo N-terminal y demostraron que la inclusión de esta glicina estabiliza la conformación helicoidal del péptido, al aumentar el número de enlaces de hidrógeno y reducir la tendencia al desorden estructural. Además, observaron que la secuencia con G-cap presentó una mayor actividad antimicrobiana, atribuyendo este efecto a la estabilización estructural conferida por la glicina en el extremo N-terminal

8.5.3 Mantenimiento de la anfipaticidad helicoidal

A partir de los análisis realizados en HeliQuest (Figura 35 y 36), se determinó la distribución de los residuos sobre la superficie de la hélice y se identificó la cara hidrofóbica y la cara hidrofílica. Sobre esta base, se decidió que toda sustitución propuesta debía preservar o reforzar dicha anfipaticidad, ya que este es uno de los determinantes clave de la capacidad de los AMPs para insertarse en membranas.

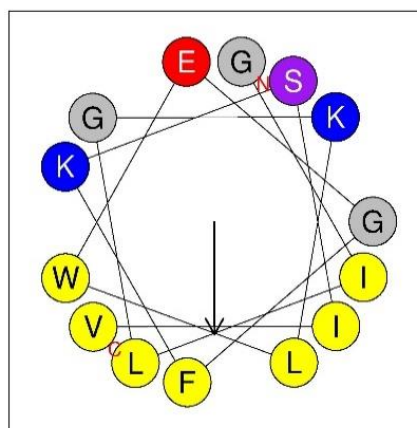


Figura 35. diagrama helicoidal de la Pantinina 1, hecho con HeliQuest. Las letras rojas N y C en los diagramas de rueda helicoidal indican los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente, las flechas negras indican el momento hidrofóbico (μH).

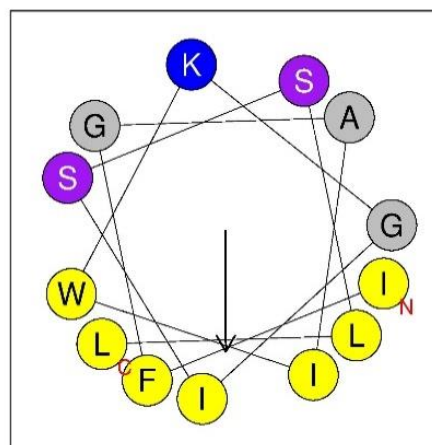


Figura 36. diagrama helicoidal de la Pantinina 2, hecho con HeliQuest. Las letras rojas N y C en los diagramas de rueda helicoidal indican los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente, las flechas negras indican el momento hidrofóbico (μH).

La primera etapa del diseño consistió en generar un conjunto amplio de variantes preliminares con el objetivo de evaluar el impacto de múltiples combinaciones de sustituciones. En esta ronda se diseñaron 25 variantes, todas con la glicina fija en la posición de inicio.

8.5.4 Cambios en el residuo inicial de Pantinina 2

Como criterio de diseño, se estableció mantener una glicina (G) en la posición 1 en todas las variantes. Por ello, las modificaciones realizadas en la Pantinina 2 se aplicaron sobre el residuo que originalmente ocupaba la posición inicial (Isoleucina), el cual pasó a ser el residuo 2 después de incorporar la G. Estos cambios se muestran de forma detallada en la tabla 2, donde se resumen las sustituciones efectuadas, junto con sus valores fisicoquímicos calculados. Esta tabla funciona como referencia visual del impacto de cada cambio sobre las propiedades globales del péptido.

Para esta etapa, el residuo Ile (I) original se sustituyó por aminoácidos con propiedades contrastantes, seleccionados estratégicamente según la característica que se buscaba modular:

N (Asparagina): residuo polar que disminuye la hidrofobicidad global y permite evaluar el efecto de reducir la contribución hidrofóbica en el extremo N-terminal.

F (Fenilalanina): residuo aromático e hidrofóbico; se utilizó para explorar si un incremento de hidrofobicidad en el extremo inicial favorecía parámetros como el momento hidrofóbico o la estabilidad estructural.

Q (Glutamina): residuo polar capaz de formar puentes de hidrógeno; se eligió por su potencial para incrementar el momento dipolar sin comprometer la organización anfipática.

Estas sustituciones permitieron determinar cómo variaciones en la posición N-terminal modifican el balance entre hidrofobicidad, polaridad y estabilidad helicoidal, lo cual resultó fundamental para seleccionar la combinación más adecuada dentro del diseño racional de pantininas.

8.5.5 Sustituciones en la región central

Además de las sustituciones en el extremo N-terminal, se realizaron modificaciones adicionales en la región central de la secuencia, donde se incorporaron residuos cargados o polares como la R (Arginina), S (Serina), E (Ácido glutámico) y K (Lisina)— según el objetivo estructural o fisicoquímico que se buscaba optimizar:

R (Arginina) y K (Lisina): para aportar carga positiva, reforzando la interacción electrostática con las membranas bacterianas ricas en fosfolípidos aniónicos y pudiendo mejorar la actividad antimicrobiana.

E (Ácido glutámico): introduce carga negativa, permitiendo ajustar la distribución de cargas y evaluar su efecto sobre la conformación helicoidal y la orientación anfipática.

S (Serina): residuo polar pequeño que puede incrementar la flexibilidad local y contribuir a la estabilidad de giros o regiones de transición dentro de la hélice.

Además, esos cambios buscaban explorar si la distribución de cargas mejoraba el momento hidrofóbico. En algunos diseños se modificó la posición relativa de residuos cargados o polares con el objetivo de ajustar la distribución sobre la superficie helicoidal, manteniendo la secuencia lo más similar posible al patrón nativo de pantininas.

Finalmente, en algunas variantes se añadió una valina (V) en el extremo N-terminal. La V, al ser hidrofóbica, se incorporó para explorar si un cierre más hidrofóbico en el extremo de la molécula favorecía una mejor inserción en la membrana o incrementaba la estabilidad de la hélice hacia el final de la secuencia.

Estas modificaciones combinadas permitieron evaluar de manera sistemática cómo los cambios dirigidos tanto en la región N-terminal como en zonas medias y en el extremo C-terminal, que influyen en las propiedades estructurales, la flexibilidad y el perfil fisicoquímico de las pantininas, facilitando la selección de la variante con mejor comportamiento global.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Variantes preliminares

En esta fase inicial, todas las secuencias diseñadas compartieron un criterio en común: mantener la glicina en el extremo N-terminal, debido a que este residuo favorece la flexibilidad local y se asocia con una mayor capacidad de interacción con membranas biológicas. A partir de esta regla base, se exploraron múltiples sustituciones en diferentes posiciones de la secuencia, particularmente aquellas orientadas a conservar la anfipaticidad de la hélice, reorganizar la carga neta o mejorar la continuidad de la cara hidrofóbica.

Para esta primera fase, se generaron un total de veinticinco variantes derivadas de la Pantinina 2. Cada una de ellas se analizó mediante la obtención de sus principales parámetros fisicoquímicos: (1) GRAVY; (2) momento hidrofóbico (μH), (3) momento dipolar (μ) y flexibilidad media intrínseca (mBf). En la tabla 2 se presentan los valores obtenidos para cada variante, lo que permitió establecer un panorama comparativo inicial del comportamiento de las secuencias modificadas.

Tabla. 2. Variantes derivadas de la Pantinina 2 y sus parámetros fisicoquímicos. En color rosa los residuos a conservar, en color rojo los residuos modificados.

Pantinina/ Variantes	SECUENCIA	GRAVY	μH	mBf	μ(D)
Pantinina 1	GILGKLWEGFKSIV	0.671	0.691	1.9654	191.6
Pantinina 2	IFGAIWKGISSLL	1.423	0.714	1.67	176.6
P2N	NFGAIWKGISSLL	0.808	0.68	1.79	186.6
P2GN	GNFGAIWKGISSLL	0.721	0.631	1.895	194.8
P2GNEK	GNFGAIWEGIKSLL	0.529	0.615	1.9289	179.2
P2Q	QFGAIWKGISSLL	0.808	0.682	1.79	182.8
P2GQ	GQFGAIWKGISSLL	0.721	0.633	1.8751	192
P2GNIRSK	GNIFGAIWRSGIKSLL	0.631	0.455	1.8583	204.4
P2GQIRSK	GQIFGAIWRSGIKSLL	0.631	0.435	1.866	205.8
P2GNRV	GNFGAIWRKGISLLV	0.613	0.421	1.8674	243.4
P2GNRSKV	GNFGAIWRSGIKSLLV	0.613	0.422	1.8542	229.4
P2GQRSKV	GQFGAIWRSGIKSLLV	0.613	0.409	1.8621	231.4
P2GNNKV	GNFGAIWNGIKSLLV	0.773	0.514	1.7892	195.2
P2GNIEKIV	GNIFGKIWEKGISILV	0.694	0.681	1.9611	243.8
P2GNIEKLV	GNIFGKIWEKGISLLV	0.65	0.514	1.9735	244
P2GRLSKI	GIFGRLWSGIKSIL	0.843	0.679	1.8034	201.6
P2GYLRKI	GIYGALWRGIKSIL	0.736	0.639	1.6708	175.2
P2GYVRK	GIYGAVWRGIKSIL	0.764	0.607	1.6744	176.4
P2GLRKI	GIYGALWRGIKSIL	0.736	0.639	1.6708	174.8
P2GYLRKIG	GIYGALWRGIKSILG	0.66	0.596	1.6728	189
P2GNFIEKIV	GNIFGKIWEKGISILV	0.694	0.515	1.9611	244
P2GKEKI	GIFGKIWEGIKSIL	0.743	0.726	1.93	204
P2GNRFQIV	GNFGRIFQKGISILV	0.647	0.531	1.9219	241.2
P2GRQKIG	GIFGRIWQGIKSILG	0.627	0.651	1.7959	213

El objetivo de este filtrado preliminar fue identificar qué variantes mostraban tendencias favorables en al menos uno de los parámetros clave asociados a la actividad antimicrobiana y la estabilidad estructural.

En esta etapa no se llevó a cabo un análisis detallado de correlaciones, sino una evaluación cualitativa inicial, observando si los cambios introducidos en las secuencias generaban variaciones positivas en comparación con la Pantinina 1. Aquellas variantes que no mostraron modificaciones relevantes o cuyo perfil fisicoquímico permanecieron prácticamente igual o incluso empeoró, fueron descartadas del proceso.

Como resultado de este primer filtrado, solo cuatro variantes conservaron características que sugerían un potencial mejorado respecto a la secuencia original. Estas variantes se agrupan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Variantes preseleccionadas tras el filtrado inicial y sus parámetros fisicoquímicos.

Pantinina/ Variantes	SECUENCIA	GRAVY	μH	mBf	μ (D)
Pantinina 1	GILGKLWEGFKSIV	0.671	0.691	1.9654	191.6
Pantinina 2	IFGAIWKGISSLL	1.423	0.714	1.67	176.6
P2GQ	GQFGAIWKGISSLL	0.721	0.633	1.8751	192
P2GNIEKIV	GNIFGKIWEKGISILV	0.694	0.681	1.9611	243.8
P2GNFIEKIV	GNIFGKIWEKGISILV	0.694	0.515	1.9611	244
P2GKEKI	GIFGKIWEGIKSIL	0.743	0.726	1.93	204

9.2 Análisis comparativo de las variantes preliminares

A partir de la Pantinina 2 se diseñó una primera ronda de 24 variantes con la regla fija de conservar una glicina (G) en la posición N-terminal. Para cada secuencia se calcularon parámetros fisicoquímicos relevantes (GRAVY, momento hidrofóbico, momento dipolar y flexibilidad intrínseca media). La Tabla 2 resume estos valores para las 25 variantes. Con el fin de visualizar patrones generales y explorar posibles relaciones entre las propiedades fisicoquímicas calculadas, se elaboraron gráficas de correlación entre los parámetros principales. Estos resultados indican que el resultado de estas variaciones homologa los índices de anfipaticidad con el correspondiente en la Pantinina 1, donde al menos 14 secuencias modificadas incrementaron el momento dipolar de las estructuras, lo que puede considerarse como un efecto de mejora en el grado de orden de estos péptidos, lo cual se sabe resulta óptimo para su bioactividad (Fernandez-Sanchez et al., 2025) (Fig. 37).

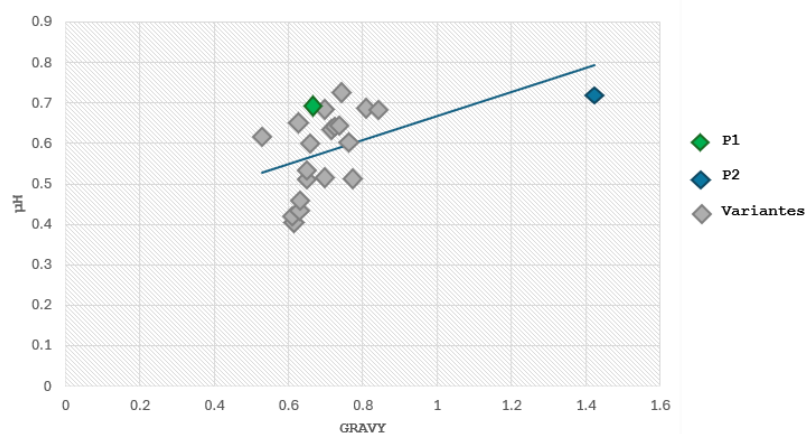


Figura 37. Relación entre el índice GRAVY y el momento hidrofóbico (μH) respecto a las pantininas 1,2 y sus primeras variantes diseñadas

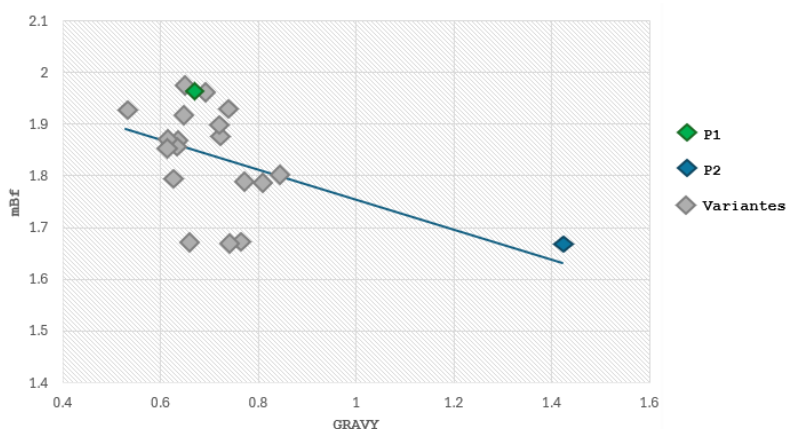


Figura 38. Relación entre el índice GRAVY y la flexibilidad intrínseca (mBf) respecto a las pantininas 1,2 y sus primeras variantes diseñadas

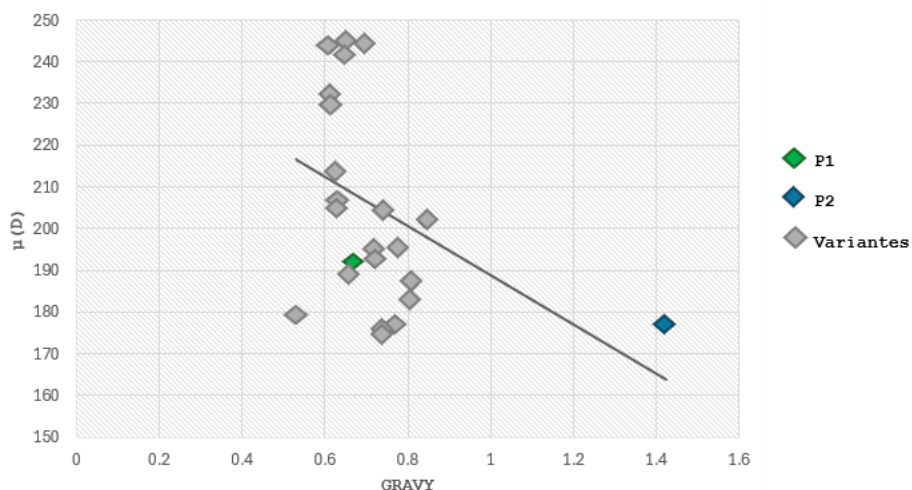


Figura 39. Relación entre el índice GRAVY y el momento dipolar (μ) respecto a las pantininas 1,2 y sus primeras variantes diseñadas

En las tres gráficas generadas para el conjunto completo de 24 variantes (Figuras 37 a 39) se observa una tendencia consistente: la dispersión de puntos tiende a concentrarse en torno a los valores de la Pantinina 1, particularmente en los parámetros GRAVY, μ_H y μ . Esto implica que las sustituciones introducidas en las distintas variantes no producen desviaciones aleatorias, sino que dirigen sistemáticamente a las secuencias hacia el perfil fisicoquímico característico de Pantinina 1, el cual se asumió como referencia funcional debido a sus propiedades antimicrobianas reportadas. Esta convergencia es una evidencia fuerte de que las modificaciones aplicadas a partir de Pantinina 2 están fortaleciendo los parámetros deseables, acercando la hidrofobicidad, el momento hidrofóbico, el momento dipolar y la flexibilidad a los rangos óptimos definidos por Pantinina 1. Por lo tanto, el comportamiento observado en el conjunto amplio de variantes respalda la eficacia del enfoque de diseño racional empleado.

Estas comparaciones permitieron identificar tendencias asociadas a los cambios estructurales introducidos y facilitaron la selección racional de las variantes más prometedoras.

9.3 Selección de variantes finales y análisis comparativo detallado

Tras el análisis global de las 24 variantes diseñadas, donde se observó que muchas de las modificaciones propuestas mostraban una tendencia consistente a aproximarse a los parámetros fisicoquímicos y biofísicos de la Pantinina 1, se realizó un proceso de filtrado para identificar aquellas secuencias con los cambios más prometedores. Este filtrado se basó en tres criterios principales:

- Aproximación a los valores de la Pantinina-1, ya que esta secuencia representa el perfil biofísico asociado con una actividad antimicrobiana previamente comprobada.

- Mejoras respecto a la Pantinina 2, cuya estructura sirvió como plantilla inicial del diseño.
- Combinación equilibrada de estabilidad estructural, hidrofobicidad y orientación anfipática, evaluada a través de los parámetros GRAVY, μH , μ y mBf.

A partir de este análisis se seleccionaron tres variantes finalistas para una revisión más profunda: P2GQ, P2GNIEKIV, y P2GNFIEKIIV, ya que fueron las que mostraron los cambios más significativos y coherentes con las propiedades esperadas en péptidos antimicrobianos.

Para estas variantes finalistas se construyeron gráficas comparativas individuales frente a Pantinina 1 y Pantinina 2:

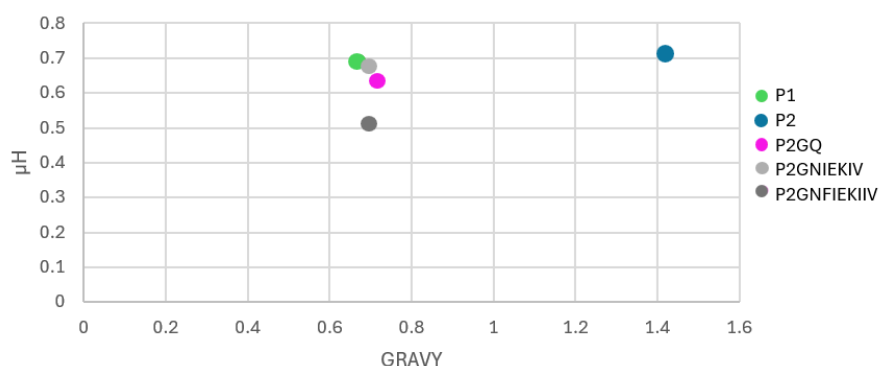


Figura 40. Relación entre el índice GRAVY y el momento hidrofóbico (μH) respecto a las pantininas 1,2 y sus variantes diseñadas

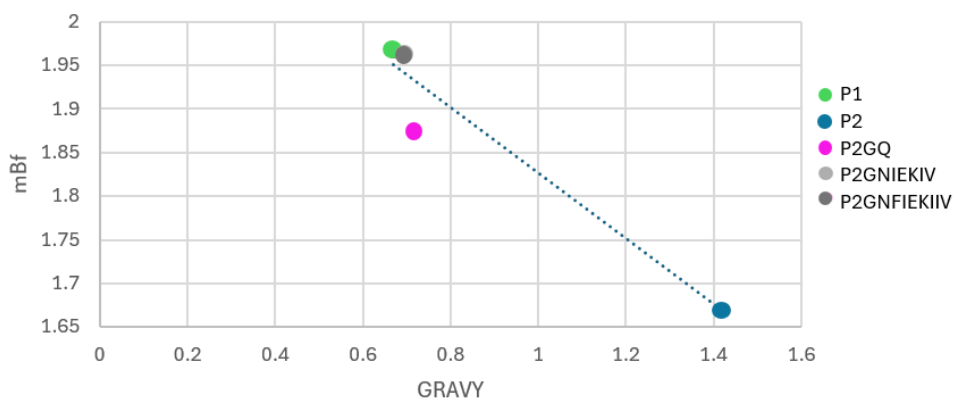


Figura 41. Relación entre el índice GRAVY y la flexibilidad intrínseca (mBf) respecto a las pantininas 1,2 y sus variantes diseñadas

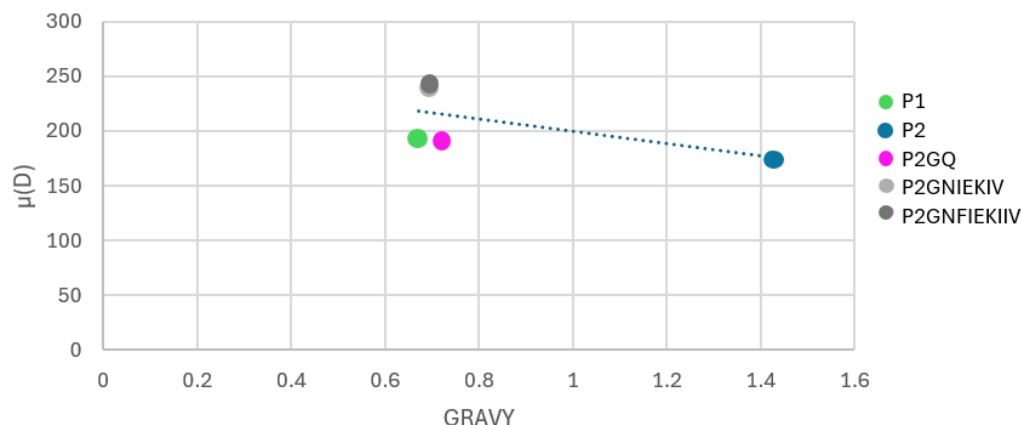


Figura 42. Relación entre el índice GRAVY y el momento dipolar respecto a las pantininas 1,2 y sus variantes diseñadas

Estas gráficas permitieron observar con mayor claridad la magnitud y dirección de los cambios generados por cada modificación puntual. Los resultados mostraron que, si bien todas las variantes seleccionadas presentaron mejoras relevantes en al menos uno de los parámetros analizados, en particular, la variante P2GQ presentó un valor de GRAVY más cercano al de la Pantinina 1, lo que refleja un equilibrio adecuado entre hidrofobicidad y solubilidad; además, mostró una disminución en el momento hidrofóbico (μ_H) similar a la Pantinina 1, compatible con una mayor orientación anfipática, característica esencial para facilitar la inserción en membranas bacterianas. De igual forma, el momento dipolar (μ) obtenido sugiere una distribución de cargas más favorable para la interacción electrostática con superficies microbianas, mientras que la mBf aumentada indica una tendencia superior a formar estructuras secundarias estables en entornos membranosos. En conjunto, estos resultados respaldan la selección de P2GQ como la variante óptima para continuar con los análisis estructurales avanzados, incluyendo dinámica molecular, estudios de potencial electrostático y evaluación de flexibilidad.

9.4 Dinámica molecular

Una vez identificada P2GQ como la variante con el perfil fisicoquímico más robusto, se procedió a realizar análisis estructurales avanzados con el fin de evaluar su estabilidad, flexibilidad y comportamiento tridimensional. Estos análisis fueron comparados directamente con Pantinina 1 y Pantinina 2 para determinar si las modificaciones implementadas no solo mejoraban los parámetros fisicoquímicos, sino que también se traducían en propiedades estructurales más favorables. Para ello, se emplearon herramientas de dinámica molecular y modelado computacional, tales como CABS-flex para estimar fluctuaciones locales y flexibilidad global, PyMOL para la visualización tridimensional del plegamiento, y APBS para el análisis del potencial electrostático superficial.

9.4.1 Análisis de fluctuaciones estructurales (RMSF) mediante CABS-flex

Para evaluar la estabilidad dinámica de cada Pantinina y determinar cómo afectaron las modificaciones introducidas en la variante P2GQ, se realizó un análisis de fluctuación por residuo (RMSF) utilizando CABS-flex. Este parámetro permite identificar qué regiones de la molécula presentan mayor movilidad durante la simulación, lo cual es relevante dado que la flexibilidad local influye directamente en la capacidad del péptido para formar estructuras secundarias, estabilizar interacciones con membranas bacterianas y mantener su orientación anfipática.

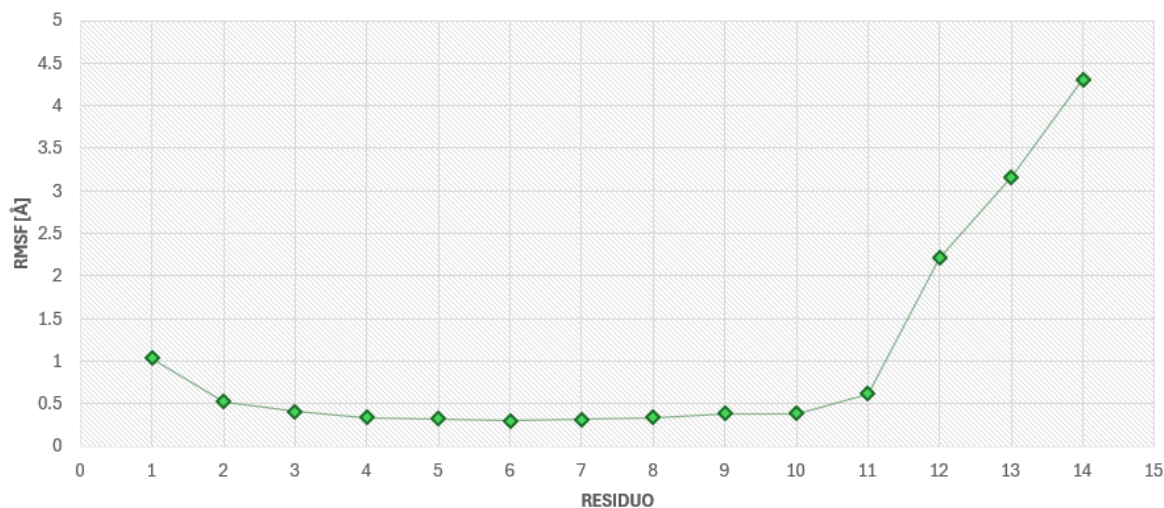


Figura 43. Fluctuación por residuo (RMSF) obtenida mediante CABS-flex para Pantinina 1

En la Pantinina 1 se observó un núcleo central relativamente estable, ya que los residuos A3–A11 mostraron valores bajos de RMSF ($\approx 1.5\text{--}0.5$ Å). Sin embargo, el comportamiento en los extremos fue muy distinto. El residuo 1 presentó una movilidad elevada (≈ 1.0 Å), mientras que el extremo C-terminal mostró un incremento pronunciado, alcanzando valores entre 2.0 y 4.3 Å. Esta fluctuación tan alta revela una región final altamente flexible o desordenada, lo que puede comprometer la estabilidad global y dificultar la formación de una hélice α continua durante su interacción con membranas. En conjunto, Pantinina 1 exhibe un núcleo rígido, pero una desestabilización marcada en su extremo final.

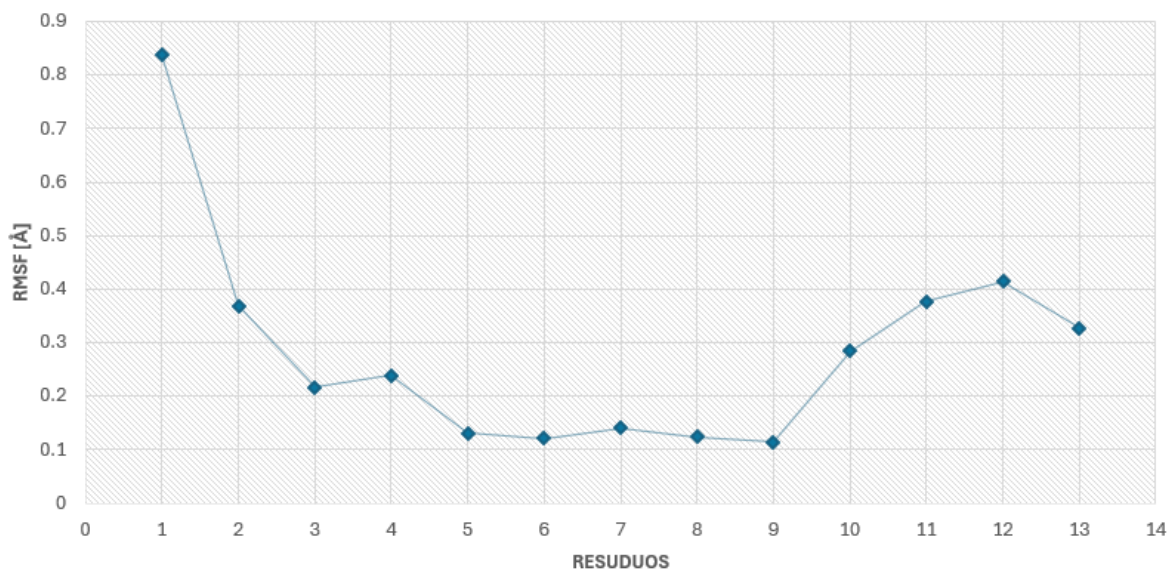


Figura 44. Fluctuación por residuo (RMSF) obtenida mediante CABS-flex para Pantinina 2

En el caso de la Pantinina 2, el comportamiento fue notablemente diferente ya que mostró un perfil dinámico más uniforme y estable en comparación con la Pantinina 1. Aunque el residuo 1 presentó una fluctuación inicial elevada (≈ 0.8 Å), el tramo comprendido entre los residuos 3–9 mantuvo valores bajos y consistentes (≈ 0.1 – 0.25 Å), indicando un núcleo estructural bien definido. En el extremo C-terminal la fluctuación aumentó, pero de manera mucho más moderada que en Pantinina 1, alcanzando máximos cercanos a 0.5 – 0.55 Å. Esta menor movilidad terminal concuerda con los parámetros fisicoquímicos obtenidos previamente y sugiere que Pantinina 2 posee una organización más rígida y estable, lo que favorece la conservación de su estructura helicoidal al interactuar con membranas.

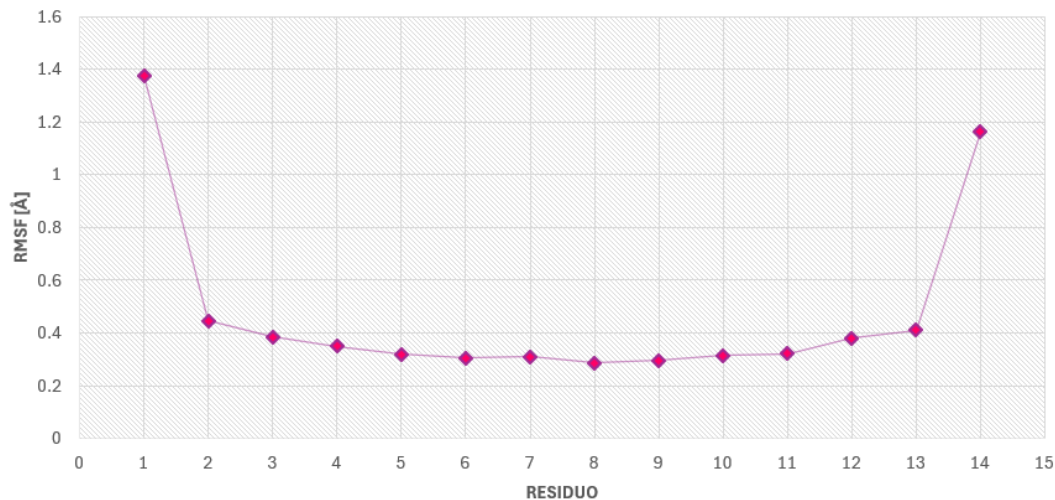


Figura 45. Fluctuación por residuo (RMSF) obtenida mediante CABS-flex para la variante P2GQ

La variante P2GQ mostró un perfil de fluctuación intermedio pero favorable. El segmento A3–A11 mantuvo valores bajos y homogéneos ($\approx 0.25\text{--}0.35 \text{ \AA}$), comparables a los de Pantinina 2, lo que indica que las modificaciones implementadas no afectaron negativamente la estabilidad del núcleo peptídico. En cuanto a la región terminal, aunque continúa siendo flexible como ocurre en péptidos cortos ricos en actividad antimicrobiana, los valores de RMSF fueron menores que los de Pantinina 1 y muy similares a los de Pantinina 2. Esto sugiere que la sustitución realizada en P2GQ no desestabilizó el extremo C-terminal y, por el contrario, favoreció una distribución de movilidad más uniforme a lo largo de la molécula. La movilidad elevada del residuo inicial puede facilitar el reconocimiento inicial de la membrana y permitir una orientación más eficiente durante la etapa de inserción. De manera similar, la flexibilidad del residuo final contribuye a que el péptido se adapte al gradiente hidrofóbico de la bicapa lipídica sin perder la estabilidad interna proporcionada por su núcleo rígido. En conjunto, esta distribución de movilidad de extremos flexibles y centro estable favorece la formación de una hélice α continua pero adaptable, optimizando la interacción de P2GQ con membranas bacterianas y reforzando su potencial como una estructura funcionalmente eficiente.

En conjunto, la variante P2GQ mantiene la estabilidad estructural observada en Pantinina 2 y corrige parcialmente la flexibilidad excesiva detectada en Pantinina 1. Esta combinación es relevante desde el punto de vista funcional, ya que una estructura con núcleo rígido, pero con extremos moderadamente flexibles suele optimizar la inserción en membranas bacterianas, permitiendo tanto la orientación anfipática como la adaptación inicial al entorno lipídico. Así, el perfil dinámico de P2GQ respalda la hipótesis de que esta variante podría presentar una actividad antimicrobiana mejorada.

9.4.2 Análisis de los mapas de contacto mediante CABS-flex

Los mapas de contactos son matrices de distancias entre todos los pares posibles de residuos al interior de una estructura tridimensional; en general, si dos residuos se encuentran cercanos, más allá de un umbral mínimo, el valor se acerca a 1.0; y 0.0 en el caso contrario. Con el fin de complementar la evaluación de estabilidad estructural derivada del análisis de RMSF, se generaron mapas de contacto para Pantinina 1, Pantinina 2 y la variante P2GQ utilizando CABS-flex. Estos mapas representan la probabilidad de que dos residuos permanezcan en proximidad durante la simulación, donde valores cercanos a 1 indican interacciones frecuentes y estables. Este tipo de análisis permite identificar la flexión interna del péptido y evaluar si las modificaciones introducidas alteran la compacidad o la continuidad estructural.



Figura 46. Mapa de contacto obtenida mediante CABS-flex para Pantinina 1

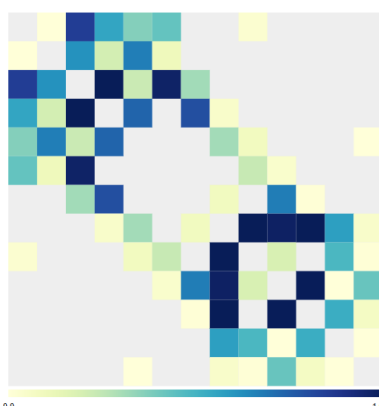


Figura 47. Mapa de contacto obtenida mediante CABS-flex para Pantinina 2



Figura 48. Mapa de contacto obtenida mediante CABS-flex para la variante P2GQ

En Pantinina 1 se observó un patrón caracterizado por dos bloques de contactos bien definidos, uno en la región N-terminal y otro hacia la zona media-final de la secuencia. Entre ambos bloques aparece una franja diagonal clara, lo que indica que dichas regiones no interactúan de forma constante entre sí. Esta distribución revela que los contactos más estables están concentrados en segmentos específicos, mientras que la topología general del péptido presenta zonas relativamente más sueltas. En términos estructurales, este patrón sugiere que Pantinina 1 posee una compacidad interna limitada y una organización menos continua, lo que coincide con la elevada fluctuación detectada en su extremo C-terminal. Aunque esta flexibilidad puede ser funcional en péptidos antimicrobianos anfipáticos, una separación excesiva entre dominios reduce la estabilidad helicoidal y puede comprometer la eficiencia de inserción en membranas bacterianas.

La variante P2GQ mostró un comportamiento notablemente distinto. Su mapa de contacto presentó una mayor densidad de interacciones estables distribuidas a lo largo de toda la matriz, con una diagonal más oscura y continua reflejando una estabilidad local incrementada entre residuos consecutivos. Además, el bloque de contactos en la región media-final se observó más intenso y mejor definido que en Pantinina 1, lo que indica un incremento en la cohesión interna del péptido. Este refuerzo en la red de interacciones puede atribuirse a la sustitución G→Q, ya que la glutamina, al poseer una cadena lateral más voluminosa y con capacidad para establecer puentes de hidrógeno adicionales, tiende a aumentar la estabilidad y compactación de la estructura.

En conjunto, la comparación entre ambos mapas confirma que la variante P2GQ adquiere una organización más compacta y estable que Pantinina 1, coherente con los parámetros físicoquímicos y el perfil dinámico previamente analizados. Esta mayor compacidad favorece la formación de una hélice más sostenida y una distribución anfipática más definida, características que suelen correlacionarse con una actividad antimicrobiana

más eficiente. Así, los datos obtenidos a partir de los mapas de contacto respaldan la selección de P2GQ como la variante finalista con mejor desempeño estructural.

9.4.3 Análisis del potencial electrostático mediante APBS

Para evaluar la distribución superficial de cargas y su posible implicación en la interacción con membranas bacterianas, se generaron mapas de potencial electrostático mediante APBS para Pantinina 1, Pantinina 2 y la variante P2GQ (Figura 49). En estas representaciones se permite visualizar regiones con carga positiva (azul), negativa (rojo) o neutra (verde), lo cual es especialmente relevante para péptidos antimicrobianos, ya que su eficacia depende en gran medida del reconocimiento electrostático inicial con las membranas ricas en fosfolípidos aniónicos de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

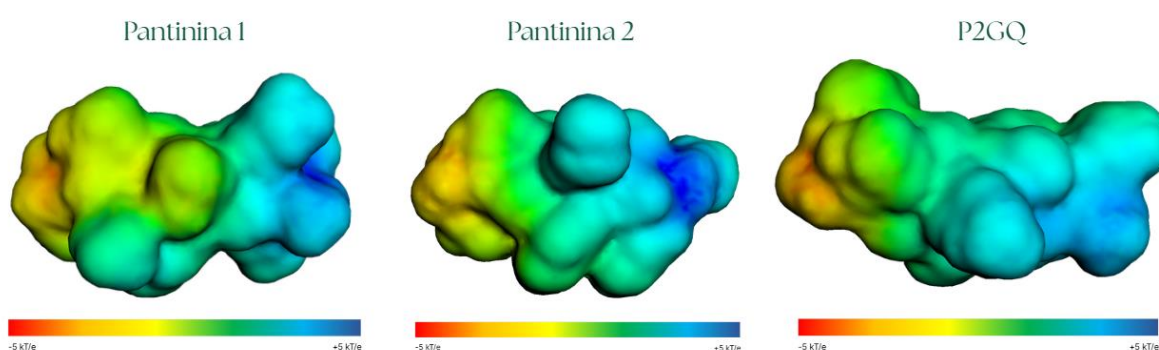


Figura 49. Mapas de potencial electrostático generados mediante APBS para Pantinina 1, Pantinina 2 y la variante P2GQ a un pH de 7.2 para simular un entorno fisiológico. Las regiones positivas se muestran en azul, las negativas en rojo y las neutras en verde.

Tabla 4. Valores de energía electrostática total calculados mediante APBS para Pantinina 1, Pantinina 2 y P2GQ. Calculados a un pH de 7.2 para simular un entorno fisiológico.

PANTININA/ VARIANTE	ENERGIA ELECTROSTATICA TOTAL
Pantinina 1	1.0714×10^4 kJ/mol
Pantinina 2	1.0600×10^4 kJ/mol
P2GQ	1.1440×10^4 kJ/mol

La Pantinina 1 presentó un patrón de carga heterogéneo, con una distribución irregular de regiones positivas y neutras a lo largo de la superficie. Aunque conserva zonas cargadas positivamente, estas no se encuentran alineadas de manera continua, lo que puede dificultar su orientación en la membrana y limitar la estabilidad de la interacción inicial. Esta dispersión electrostática podría estar relacionada con la flexibilidad excesiva observada en el análisis de RMSF, promoviendo conformaciones menos optimizadas para el reconocimiento membranal.

En contraste, la Pantinina 2 mostró una distribución electrostática más definida y extensa de cargas positivas, formando un frente electrostático continuo que podría facilitar la atracción hacia membranas bacterianas. La presencia de una región catiónica más uniforme es consistente con su mayor estabilidad estructural y con los parámetros fisicoquímicos previos que la caracterizan como más organizada que Pantinina 1.

La variante P2GQ exhibió un patrón aún más pronunciado de organización electrostática, este alineamiento contribuye directamente a reforzar la anfipaticidad funcional, ya que permite que la superficie cargada interactúe eficientemente con la membrana bacteriana mientras que la cara hidrofóbica se inserta en el núcleo lipídico. Además, la presencia de la glutamina añadida en posición 2 contribuye a un entorno electrostático más estable debido a su capacidad para formar interacciones polares y estabilizar la conformación local, lo cual se correlaciona con la mayor compactación observada en los mapas de contacto y con la distribución de flexibilidad más homogénea mostrada en los análisis de RMSF.

Los valores de energía electrostática total calculados mediante APBS (Tabla 4) respaldan estas observaciones, mostrando que P2GQ posee la energía electrostática más alta del conjunto, lo que sugiere un potencial de interacción más favorable con superficies cargadas negativamente. En conjunto, el análisis confirma que P2GQ optimiza la organización electrostática vista en Pantinina 2 y corrige las irregularidades presentes en Pantinina 1, lo cual podría favorecer una mayor eficiencia en el reconocimiento y permeabilización de membranas bacterianas.

9.4.4 Análisis estructural tridimensional mediante PyMOL

Las representaciones tridimensionales obtenidas en PyMOL (Figura 50) permiten visualizar de manera directa la organización espacial, la distribución anfipática y las diferencias estructurales entre Pantinina 1, Pantinina 2 y la variante diseñada P2GQ.

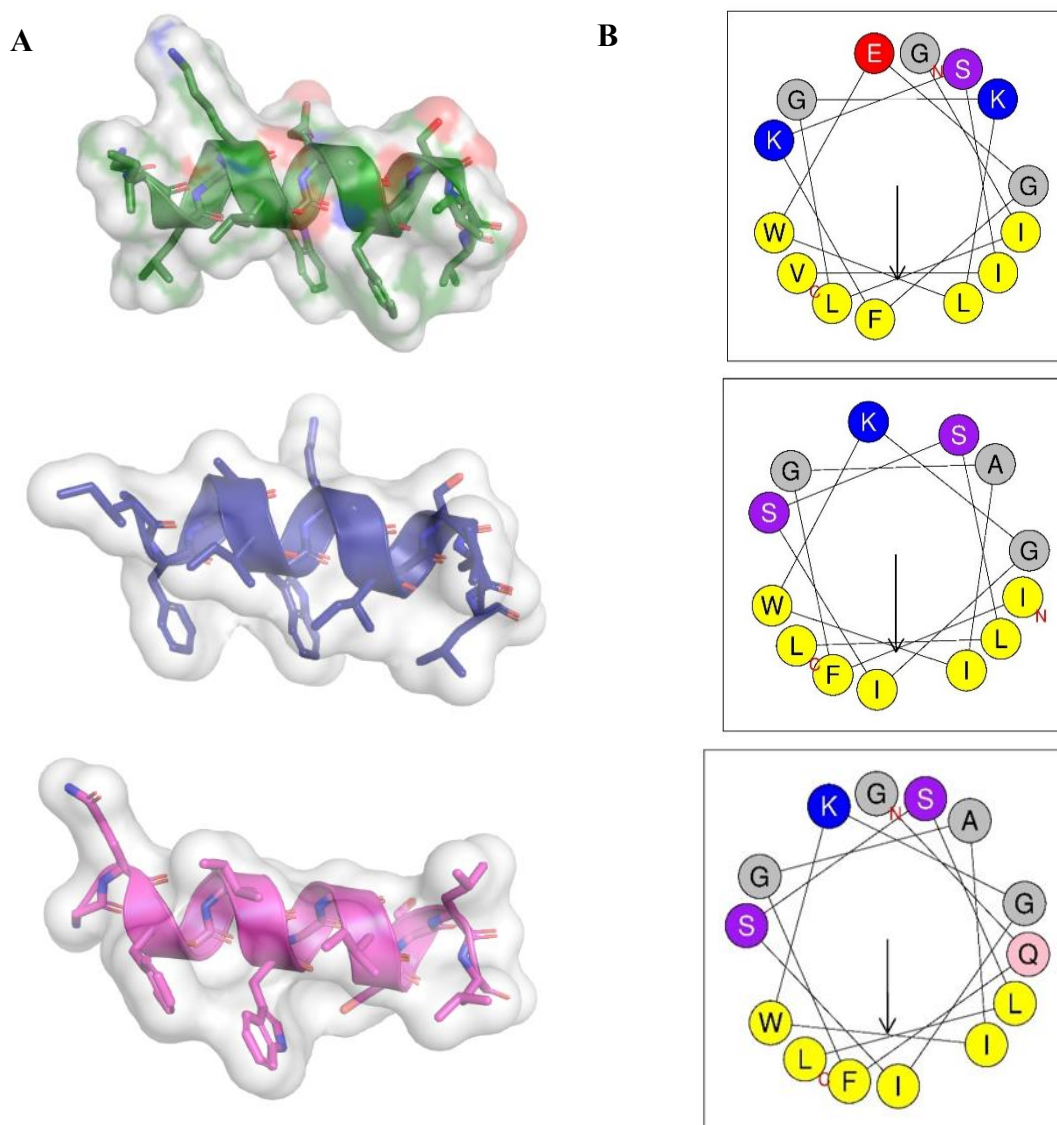


Figura 50. *A* Estructura tridimensional de Pantinina 1, Pantinina 2 y la variante P2GQ modelada en PyMOL, cada uno con su respectivo diagrama de rueda helicoidal correspondiente *B*, las letras rojas N y C en los diagramas de rueda helicoidal indican los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente, las flechas negras indican el momento hidrofóbico (μH).

En general, las tres secuencias muestran una tendencia a formar una α -hélice corta, como es característico en muchos péptidos antimicrobianos catiónicos. Sin embargo, las variaciones en la rigidez, la continuidad helicoidal y la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrófilos evidencian diferencias importantes con implicaciones funcionales.

En la Pantinina 1 se observa una hélice menos uniforme, con ligeros desvíos y una curvatura pronunciada hacia el extremo C-terminal. Este comportamiento visual concuerda con los resultados de RMSF, en donde dicho extremo presenta fluctuaciones elevadas. La superficie hidrofóbica aparece fragmentada, interrumpida por residuos polares, lo que sugiere

una organización anfipática menos definida. Esta falta de cohesión podría afectar la capacidad del péptido para insertarse con firmeza en la bicapa lipídica, reduciendo la eficiencia de la interacción con membranas bacterianas.

La Pantinina 2 muestra una hélice más continua y estable, con menor curvatura y una distribución más clara de las caras hidrofóbica e hidrofílica. Los residuos aromáticos e hidrofóbicos se agrupan más evidentemente hacia una de las caras de la hélice, mientras que los cargados se proyectan hacia el solvente. Esta organización es consistente con el mayor momento hidrofóbico y la mejor estabilidad dinámica calculada previamente. Visualmente, la Pantinina 2 presenta una estructura más “ordenada”, lo cual respalda su mejor desempeño relativo frente a Pantinina 1.

La variante P2GQ exhibe la conformación más uniforme y compacta de las tres. El agregado de glicina en la posición inicial no rompe la hélice, pero sí permite un acomodo más flexible del extremo N-terminal, mientras que la sustitución de isoleucina por glutamina en la segunda posición parece favorecer una alineación más estable del eje helicoidal. En PyMOL se aprecia una hélice muy continua, con poca desviación y una clara separación entre las caras hidrofóbica e hidrofílica, lo que indica una anfipaticidad mejor definida. Las cadenas laterales se orientan de manera más coherente, reforzando una estructura que visualmente parece más rígida y funcional para la interacción con membranas. Esta apariencia más compacta coincide con el incremento del momento hidrofóbico, la mejora en el momento dipolar y el aumento significativo de la mBf encontrados durante el análisis fisicoquímico.

Las estructuras generadas con PyMOL confirman que los cambios introducidos en la variante P2GQ no desestabilizan la estructura original; por el contrario, promueven una hélice más coherente, con mejor distribución de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, y con mayor potencial para insertarse eficazmente en ambientes membranosos. Estas observaciones complementan y refuerzan los resultados provenientes de dinámica molecular y de los análisis fisicoquímicos, justificando la selección de P2GQ como la variante estructuralmente más prometedora.

9.5 Análisis comparativo

El análisis de las pantininas mediante herramientas de dinámica molecular permitió avanzar progresivamente desde la evaluación de la flexibilidad de cada residuo hasta la caracterización de la arquitectura interna y la distribución de cargas superficiales. En conjunto, estos estudios ofrecen una visión integral de cómo las modificaciones introducidas en la variante P2GQ alteran la estabilidad, la compactación estructural y el potencial de interacción con membranas bacterianas.

9.5.1 De las fluctuaciones a la interacción interna

El punto de partida fue la cuantificación de la movilidad de cadena lateral, mediante RMSF. Los resultados demostraron que Pantinina 1 presenta un extremo C-terminal particularmente flexible, con fluctuaciones que alcanzan valores elevados; esta característica sugiere una región desordenada que podría comprometer la coherencia estructural del péptido. En contraste, Pantinina 2 mostró un perfil más homogéneo y estable. La variante P2GQ conservó esta estabilidad y la distribuyó de manera más uniforme, lo que indica que los cambios introducidos no desestabilizaron la conformación global y, de hecho, podrían favorecer la continuidad helicoidal requerida para la inserción en membrana.

Estos hallazgos se confirmaron mediante los mapas de contacto, donde Pantinina 1 exhibió bloques de interacción separados que revelan menor compactación. Por el contrario, P2GQ mostró un mapa notablemente más denso, con una diagonal continua y bloques más definidos, señalando una estructura más cohesiva. La sustitución I→Q y la adición de la glicina inicial parecen favorecer interacciones internas adicionales, fortaleciendo el empaquetamiento global del péptido.

9.5.2 Del reforzamiento estructural al paisaje electrostático

Una vez establecida la estabilidad estructural, se evaluó cómo estas diferencias se manifiestan en el potencial electrostático superficial. El análisis con APBS mostró que Pantinina 1 posee una distribución de cargas menos definida, con regiones dispersas de potencial positivo que podrían limitar su orientación al interactuar con membranas cargadas negativamente. La Pantinina 2 ya presentaba una superficie más organizada, con zonas catiónicas más concentradas. La variante P2GQ, sin embargo, destacó al exhibir una superficie electrostática más continua y coherente, con un frente claramente positivo que facilita la atracción e interacción inicial con la bicapa lipídica bacteriana. Esto sugiere que la reorganización de cargas inducida por la glutamina contribuye a mejorar el perfil electrostático del péptido.

9.5.3 De la electrostática a la estructura tridimensional

Finalmente, las visualizaciones tridimensionales en PyMOL permitieron corroborar de forma cualitativa estas observaciones. La Pantinina 1 mostró una hélice menos definida y una zona terminal más expuesta y desordenada, coherente con los altos valores de RMSF. Pantinina 2 exhibió una estructura más compacta, aunque con cierta curvatura que refleja una estabilidad intermedia. En cambio, la variante P2GQ presentó la arquitectura más homogénea entre las tres, con una hélice alfa más continua, un empaquetamiento lateral más compacto y una separación clara entre la cara hidrofóbica y la hidrofílica, lo que refuerza su carácter anfipático. Esta disposición es esencial para los péptidos antimicrobianos, ya que facilita la inserción en membrana y la posterior desestabilización de la bicapa bacteriana.

La integración de los análisis de flexibilidad, contactos internos, potencial electrostático y estructura tridimensional permite afirmar que la variante P2GQ presenta

mejoras claras respecto a la Pantinina 1 y la Pantinina 2. Sus niveles de fluctuación más homogéneos, su mayor compactación interna, la organización más definida de cargas y su arquitectura tridimensional más coherente sugieren que los cambios introducidos favorecen la estabilidad, la anfipaticidad y el potencial de interacción con la membrana bacteriana. En conjunto, estos datos respaldan a P2GQ como una variante con características estructurales superiores, potencialmente vinculadas a una mayor actividad antimicrobiana y a un desempeño funcional más eficiente.

10. CONCLUSIÓN

En este trabajo se estableció un enfoque racional para el diseño de variantes de pantininas a partir de la secuencia de la Pantinina 2, basado en la optimización de parámetros fisicoquímicos, estructurales y dinámicos asociados a la actividad antimicrobiana. El análisis comparativo de las variantes generadas permitió identificar tendencias claras que aproximaron progresivamente sus propiedades a las de la Pantinina 1, considerada la referencia funcional, destacando la variante P2GQ como la candidata con el mejor equilibrio entre hidrofobicidad, anfipaticidad, distribución de cargas y estabilidad conformacional. Los estudios de dinámica molecular, potencial electrostático y visualización estructural confirmaron que P2GQ mantiene la integridad estructural del péptido original, al tiempo que presenta una organización anfipática más definida y un comportamiento dinámico compatible con una interacción eficiente con membranas bacterianas. Si bien se requieren estudios experimentales para confirmar su actividad antimicrobiana, los resultados sugieren que P2GQ es un candidato prometedor para evaluaciones futuras y respaldan el uso de herramientas computacionales como una estrategia eficiente y de bajo costo para el diseño racional de péptidos con potencial farmacológico.

11. REFERENCIAS

1. Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Taniguchi, T., Anzai, K., & Kirino, Y. (1991). Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 20218–20222.
2. Ageitos, L., Torres, M. D. T., & de la Fuente-Núñez, C. (2022). Biologically active peptides from venoms: Applications in antibiotic resistance, cancer, and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15437. <https://doi.org/10.3390/ijms232315437>
3. Amorim, F., Cordeiro, F., Pinheiro, E., Boldrini, J., & Arantes, E. (2018). Microbial production of toxins from the scorpion venom: Properties and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), 6319–6331. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9122-2>
4. Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
5. Barbosa, F. A. R., Silva, A. V. F., Oliveira, J. T. A., Vasconcelos, I. M., & Moreno, F. B. (2017). Stigmurin, a scorpion venom peptide with antimicrobial activity: Mechanisms and potential applications. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23(1), 1–12.
6. Barbosa, J. E., Silva, J. C., Oliveira, D. G., Silva, A. R., & Borges, M. H. (2017). Stigmurin: A scorpion venom peptide active against drug-resistant bacteria. *Toxicon*, 136, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.06.006>
7. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
8. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
9. Carugo, O. (2018). Atomic displacement parameters in structural biology. *Amino Acids*, 50(7), 775–786. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2579-3>
10. Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 178–182. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010204>
11. Cesa-Luna, C., Muñoz-Rojas, J., Saab-Rincón, G., Báez, 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), e0222438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>
12. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
13. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745.

- <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
14. da Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F., Lima, L. A., Sampaio, K. B., Dohms, S. M., ... & Franco, O. L. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*, 22(2), 234–248.
 15. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02648-5)
 16. De la Fuente, N. M., Villarreal, J. M., Díaz, M. A., & García, A. P. (2015). Evaluation of the activity of antimicrobial agents against the challenge of bacterial resistance. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46, 7–16.
 17. Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1031(2), 143–161. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90006-X)
 18. Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5(13), 1213–1219.
 19. Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1982). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(15), 415–419. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.15.415>
 20. Eisenberg, D. (1994). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 581–614. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.003053>
 21. Fernandez-Sánchez, F., Flores-Ávila, J., García, H. S., Mixcoha, E., & Balleza, D. (2025). *Molecular dynamics study of the helix-to-disorder transition in short antimicrobial peptides from Urodacus yaschenkoi*. *Eur Biophys J* 54, 135–148 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00249-025-01740-4>
 22. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 37–51.
 23. Fong, P., Ramírez, V., Quintero, V., & Balleza, D. (2024). A critical review of short antimicrobial peptides from scorpion venoms, their physicochemical attributes, and potential for the development of new drugs. *Journal of Membrane Biology*, 257, 165–205. <https://doi.org/10.1007/s00232-024-00315-2>
 24. Friedberg, F., & Peirce, G. (1947). Studies on peptides and proteins: I. Properties of peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 168(2), 1–13.
 25. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

26. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
27. Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., & Giri, B. (2021). Scorpion venom: Biochemistry, pharmacology and therapeutic applications. *Toxicon*, 193, 42–55.
28. Haiyang, Y., & Quiñones, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 20. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2021000300020
29. Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–1557.
30. Holstein, N., Torres, J., & Prendini, L. (2017). Morphological variation and systematics of the emperor scorpion *Pandinus imperator*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 181(3), 623–646.
31. Hoyle, B. D., & Costerton, J. W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms. *Progress in Drug Research*, 37, 91–105.
32. Isbister, G. K., & Gaudins, A. (2003). Scorpion envenomation in Australia: Clinical aspects and treatment. *Toxicon*, 41(7), 877–886.
33. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
34. Kabelka, I., & Vácha, R. (2019). Optimal conditions for peptide aggregation revealed by molecular simulations. *eLife*, 8, e47946. <https://doi.org/10.7554/eLife.47946>
35. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
36. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2020). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–12.
37. Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: Functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332.
38. Nelson, D., & Cox, M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman.
39. Nomura, K., Corzo, G., Nakajima, T., & Iwashita, T. (2004). Orientation and pore-forming mechanism of a scorpion pore-forming peptide bound to magnetically oriented lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 87(4), 2497–2507. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.043513>
40. Pérez-Gracia, M. T. (2021). La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos.
41. Poole, K. (2012). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 20(5), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.02.004>

42. Prendini, L. (2004). Systematics of the family Scorpionidae: Phylogeny, biogeography and classification. In G. A. Polis (Ed.), *The Biology of Scorpions* (pp. 347–393). Stanford University Press.
43. Quintero, V., Cesa, C., & Muñoz, J. (2017). Péptidos antimicrobianos de alacrán. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9201>
44. Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports*, 27(4–5), 189–223. <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z>
45. Ramírez, M. G., Rodríguez, R. A., & Ávila, E. E. (2023). Péptidos antimicrobianos: Moléculas pequeñas pero efectivas. *Avance y Perspectiva*, 9, 65.
46. Rein, J. O. (2023). *Pandinus imperator*. The Scorpion Files. Norwegian University of Science and Technology. <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>
47. Rodríguez, A., Villegas, E., & Corzo, G. (2014). Venenos arácnidos: Su sorprendente poder insecticida y su rara capacidad antibiótica. *Revista Digital Universitaria*, 15. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art85/index.html>
48. Salazar-Hernández, D. (2023). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra aislados bacterianos de interés clínico. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19358>
49. Shah, P., Ali, F., Noor-ul-H., Qayyum, S., Ahmed, S., Haleem, K., ..., & Khan, I. (2018). Scorpion venom: A poison or a medicine – Mini review. *Indian Journal of Geo Marine Science*, 47, 773–778.
50. Smith, D. K., Radivojac, P., Obradovic, Z., Dunker, A. K., & Zhu, G. (2003). Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Science*, 12(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1110/ps.0237203>
51. Spratt, B. G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 264(5157), 388–393. <https://doi.org/10.1126/science.8153626>
52. Stan, D., Enciu, A. M., Mateescu, A. L., Ion, A. C., Brezeanu, A. C., Stan, D., & Tanase, C. (2021). Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 723233.
53. Téllez, G., & Castaño, J. (2010). Antimicrobial peptides. *Infectio*, 14, 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
54. Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 5023–5031. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>
55. van der Meijden, A., Coelho, P., & Rasko, M. (2010). Kinetic performance in scorpions: Morphology and performance in two large scorpion species. *Journal of Experimental Biology*, 213(13), 2187–2195.
56. Vega, N. M., Allison, K. R., Samuels, A. N., Klempner, M. S., & Collins, J. J. (2014). Salicylate enhances antibiotic resistance of biofilms by activating stress responses in bacteria. *PNAS*, 110(22), 887–896.

57. Vélez, A., Mera, C., Orduz, S., & Branch, J. (2021). Synthetic antimicrobial peptides generation using recurrent neural networks. *DYNA*, 88, 210–219. <https://doi.org/10.15446/dyna.v88n216.88799>
58. Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
59. World Health Organization. (2023). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
60. World Health Organization. (2024). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO Press.
61. Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
62. Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395.
63. Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2013). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*, 65(7), 598–607.
64. Zeng, X. C., Zhou, L., Shi, W., Luo, X., Zhang, L., Nie, Y., Wang, J., Wu, S., Cao, B., & Cao, H. (2013). Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides*, 45, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.026>
65. Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19

12. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

aa → Aminoácidos
AMPs → Péptidos antimicrobianos (Antimicrobial Peptides)
CL → Cardiolipina
EPS → Sustancias poliméricas extracelulares (Extracellular Polymeric Substances)
GRAVY → Promedio global de hidropatía (Grand Average of Hydropathy)
HPLC → Cromatografía líquida de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography)
LPS → Lipopolisacárido
mBf → Factor B de movilidad atómica promedio
nBf → Factor B normalizado
PBPs → Proteínas ligadoras de penicilina (Penicillin-Binding Proteins)
PDB → Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank)
PE → Fosfatidiletanolamina
PG → Fosfatidilglicerol
pI → Punto isoelectrico
PO₄⁻ → Grupo fosfato
PS → Fosfatidilserina
RMSF → Fluctuación cuadrática media por residuo (Root Mean Square Fluctuation)
μ → Momento dipolar
μH → Momento hidrofóbico

13. APÉNDICES

Apéndice A. Índice GRAVY

El índice GRAVY (*Grand Average of Hydropathy*) es un parámetro que representa el promedio de los valores de hidrofobicidad de todos los aminoácidos que conforman una secuencia peptídica. Este índice proporciona una medida global del carácter hidrofóbico o hidrofílico de una molécula, y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$GRAVY = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N H_i$$

Valores positivos de GRAVY indican una secuencia predominantemente hidrofóbica, mientras que valores negativos reflejan un carácter más hidrofílico. El índice GRAVY es ampliamente utilizado para inferir propiedades como solubilidad, afinidad por membranas y comportamiento general en medios acuosos.

En esta investigación, el índice GRAVY se calculó mediante la herramienta ProtParam, lo que permitió comparar de manera cuantitativa el carácter hidrofóbico global de las variantes de pantininas diseñadas respecto a la secuencia de referencia. La definición e interpretación del índice GRAVY se basan en la escala de hidropatía propuesta por Kyte y Doolittle (1982), así como en la implementación computacional descrita por Gasteiger y colaboradores (2005).

Apéndice B. Momento hidrofóbico

El momento hidrofóbico (μH) es un parámetro que cuantifica la distribución anisotrópica de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de una estructura peptídica. Conceptualmente, es análogo al momento dipolar eléctrico; sin embargo, en lugar de considerar cargas eléctricas, se basa en valores de hidrofobicidad asignados a cada aminoácido. Se define matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

$$\mu H = \sqrt{(\sum_i H_i \cos \theta_i)^2 + (\sum_i H_i \sin \theta_i)^2}$$

donde H_i representa el valor de hidrofobicidad del residuo i y θ_i el ángulo correspondiente a su posición en la estructura secundaria, particularmente en hélices α . Valores elevados de μH indican una marcada anfipaticidad, característica de péptidos capaces de interactuar con interfaces lípido-agua.

En el presente estudio, el momento hidrofóbico se calculó utilizando la herramienta HeliQuest, lo que permitió comparar la anfipaticidad de las distintas variantes de pantininas respecto a las secuencias de referencia.

El concepto de momento hidrofóbico y su formulación matemática se basan en los trabajos clásicos de Eisenberg y colaboradores (1982, 1994), en los cuales se establece la relación entre la anfipaticidad y la estructura secundaria de péptidos y proteínas.

Apéndice C. Flexibilidad intrínseca

La flexibilidad intrínseca de una secuencia peptídica se refiere a la capacidad de sus residuos para experimentar fluctuaciones conformacionales locales. Esta propiedad depende de la naturaleza química de las cadenas laterales y del contexto secuencial inmediato, y se encuentra estrechamente relacionada con la dinámica estructural del péptido.

La flexibilidad intrínseca influye en procesos como la adaptación conformacional, la estabilidad estructural y la interacción con blancos biológicos. Regiones con mayor flexibilidad suelen asociarse con zonas funcionalmente relevantes, mientras que regiones más rígidas contribuyen a la estabilidad global de la estructura.

Aunque la flexibilidad intrínseca no se expresa mediante una ecuación única, puede estimarse indirectamente a través de parámetros que describen la movilidad atómica, como el Factor B, el cual se describe en detalle en el Apéndice D.

La descripción de la flexibilidad intrínseca se basa en estudios previos sobre parámetros de flexibilidad derivados de estructuras proteicas y en enfoques predictivos empleados en herramientas computacionales (Smith et al., 2003; Carugo, 2018).

Apéndice D. Factor B

La flexibilidad intrínseca de una secuencia peptídica se refiere a la capacidad de los residuos de aminoácidos para experimentar movimientos conformacionales locales, particularmente a nivel de la cadena lateral. Esta propiedad puede estimarse a partir de parámetros derivados del Factor B, también conocido como parámetro de desplazamiento atómico, el cual se asocia con la movilidad de los átomos en estructuras proteicas.

En este trabajo, la flexibilidad intrínseca de las pantininas se evaluó mediante el programa FlexiProt 3.0, una herramienta de análisis predictivo que estima la flexibilidad de la cadena lateral basándose en parámetros de desplazamiento atómico obtenidos a partir de estructuras de alta resolución depositadas en el PDB. Los valores de Factor B utilizados por FlexiProt corresponden a factores B normalizados, los cuales se derivan de una distribución de valor extremo (distribución de Gumbel), y no de una distribución normal.

FlexiProt emplea un enfoque de análisis local, en el cual la flexibilidad de cada residuo depende del contexto secuencial inmediato. Específicamente, el programa calcula la flexibilidad considerando tríadas de aminoácidos, donde la flexibilidad del residuo central está influenciada por los residuos adyacentes en los extremos amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-C=O$). Como consecuencia de este enfoque, los residuos localizados en los extremos N- y C-terminal de la secuencia no generan valores de flexibilidad, por lo que se recomienda la inclusión de residuos flexibles al inicio y al final de la secuencia para el análisis. Con base en estos parámetros, FlexiProt asigna valores de flexibilidad intrínseca a cada residuo, permitiendo clasificar los aminoácidos en un continuo que va desde residuos más rígidos hasta residuos altamente flexibles. A partir de los valores individuales de flexibilidad, en este estudio se calcularon el Factor B de movilidad atómica promedio (mBf), que representa la flexibilidad media de la secuencia, y el Factor B normalizado (nBf), que permite la comparación relativa de la flexibilidad entre distintas variantes de pantininas.

La metodología descrita en este apéndice se basa en la documentación del programa FlexiProt 3.0 y en los trabajos de Smith et al. (2003) y Carugo (2018) sobre parámetros de desplazamiento atómico y flexibilidad proteica, a partir de estructuras de alta resolución depositadas en el Protein Data Bank.

Apéndice E. Momento dipolar

El momento dipolar (μ) es una magnitud vectorial que describe la separación espacial entre cargas eléctricas de signo opuesto dentro de una molécula. En el contexto de péptidos y pantininas, el momento dipolar refleja la distribución asimétrica de cargas parciales a lo largo de la estructura, lo cual influye directamente en su orientación frente a campos eléctricos, superficies polares y membranas biológicas.

El momento dipolar se representa mediante el símbolo griego μ y se expresa en unidades de Debye (D), 1 Debye es igual a $3.34 \times 10^{-30} \text{ Cm}$. Desde un punto de vista físico, el momento dipolar total de una molécula puede definirse como la suma vectorial de cada carga puntual multiplicada por su posición relativa respecto a un origen de referencia, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\vec{\mu} = \sum_i q_i \vec{r}_i$$

Donde $\vec{\mu}$ es el vector del momento dipolar; q_i es la magnitud de la i^{th} carga y $\vec{r}_i$ es el vector que representa la posición de i^{th} carga. Valores elevados de μ indican una marcada polarización molecular, lo que puede favorecer interacciones electrostáticas con membranas cargadas negativamente u otras superficies polares.

En este trabajo, el momento dipolar se estimó a partir de modelos estructurales generados mediante AlphaFold, complementados con herramientas de análisis vectorial disponibles en [dipole.proteopedia](#), lo que permitió evaluar comparativamente el efecto de las modificaciones introducidas en las variantes de pantininas sobre su polarización global. La descripción conceptual y metodológica de este parámetro se basa en literatura clásica de biofísica molecular y en los lineamientos descritos por Eisenberg y colaboradores (1982, 1994), así como en la documentación asociada a las herramientas computacionales utilizadas.